

**UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOSYNTHESE
UND HETEROGENITÄT VON PHYTOCHROM
AUS ETIOLIERTEM HAFER**

RUDOLF SCHENDEL

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554821_0051

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rüdiger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Scheer

Tag der mündlichen Prüfung: 4. August 1988

UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOSYNTHESE UND HETEROGENITÄT

VON PHYTOCHROM

AUS ETIOLIERTEM HAFER

Dissertation

der

Fakultät für Biologie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt von

Rudolf Schendel

aus München

Juni 1988

Abkürzungen

AIEF	Agarose-Isoelektrische Fokussierung
AK	Antikörper
ALA	5-Aminolävulinsäure (=δ-ALA)
APS	Ammoniumpersulfat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-indolylphosphat
Bq	Bequerel
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DR	Dunkelrot
DK	Dunkelkontrolle
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FG	Frischgewicht
GABA	Gabaculin
HA	Hydroxylapatit
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazino-N'-2-ethansulfonsäure
HR	Hellrot
HR-DR	Hellrot-Dunkelrot
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt (=pI)
IgG	Immunoglobulin G
kD	Kilodalton
KPP	Kaliumphosphat
MB	Milchpuffer
MBA	Methylenbisacrylamid
Mr	relatives Molekulargewicht
β-ME	2-Mercaptoethanol
NC	Nitrocellulose
oligo-dT	Oligodesoxythymidylsäure
PEI	Polyethylenimin
PAG	Polyacrylamidgel
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
PE	Phytochrom-Einheit
Pfr	Dunkelrot absorbierende Form von Phytochrom
pI	Isoelektrischer Punkt (=IEP)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly A	Polyriboadenylsäure
PPO	2,5-Diphenyloxazol
Pr	Hellrot absorbierende Form von Phytochrom
PVP	Polyvinylpyrrolidon
SAR	spezifisches Absorptionsverhältnis A ₆₆₆ : A ₂₈₀
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TCA-SSA	Trichloressigsäure-Sulfosalicylsäure
TEMED	Tetramethylethylen-diamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UAIEF	Urea(Harnstoff)Agarose-Isoelektrische Fokussierung
UE	Untereinheit
WL	Weißlicht
ΔΔA	Absorptionsdifferenz
	ΔΔA = (A ₆₆₆ -A ₇₃₀)Pr-Form - (A ₆₆₆ -A ₇₃₀)Pfr-Form

I. Einleitung	1
1. Phytochrom ein Sinnespigment in Pflanzen	1
1.1. Allgemeine Eigenschaften von Phytochrom	1
1.2. Biosynthese des Chromoproteins	4
1.3. Unterschiedliche Phytochrome	6
1.4. Aufgaben- und Problemstellung	7
II. Ergebnisse und Diskussion	8
1. Untersuchungen zur Chromophor- und Proteinbiosynthese von Phytochrom	8
1.1. In Vivo-Markierung des Pr-Chromophors mit δ -Aminolävulin- säure und mit [1-14C] oder [5-14C]2-Oxoglutarat	8
1.1.1. Markierung mit δ -Aminolävulinsäure	8
1.1.2. Markierung mit [1-14C] oder [5-14C]2-Oxoglutarat	10
1.2. In Vivo-Inkubation von Avena Keimlingen mit Gabaculin	20
1.2.1. Hemmung der Chromophorbiosynthese durch Gabaculin	20
1.2.1.1. Inkubation mit Biliverdinlösung und Lävulinsäure	24
1.2.2. Proteolytischer Vergleich von Apoprotein und Chromoprotein	25
1.3. Abschließende Diskussion	28
2. Untersuchungen zur Heterogenität von Phytochrom	30
2.1. Isoelektrische Fokussierung von nativem Pr, Pfr	30
2.1.1. pI von Phytochrom	31
2.1.2. Native Gelelektrophorese	34
2.1.3. Diskussion	36
2.2. Fokussierung in denaturierenden Gelen	38
2.2.1. Unterschied Pr - Pfr	44
2.2.2. Refokussierung	48
2.2.3. 2D-Gele und denaturierende isoelektrische Fokussierung in Acrylamidgelen	52
2.2.4. Fokussierung von Rohextrakten und Nachweis der Phytochromisobanden über Immunoblotanalyse	55
2.2.4.1. Fokussierung von Extrakten aus HR bestrahlten und unbelichteten Koleoptilen	56
2.2.4.2. Fokussierung von Extrakten, die unter stark reduktiven Bedingungen hergestellt wurden	58

2.2.4.3. Fokussierung von Extrakten unterschiedlicher Haftersorten	60
2.2.4.4. Fokussierung von Extrakten aus unterschiedlichen Pflanzenorganen	62
2.2.5. Spaltstellenkartierung der Isoformen	63
2.2.6. Untersuchungen zum Nachweis posttranslationaler Modifikationen als Ursache der Heterogenität	68
2.2.6.1. Chromophornachweis in den Isobanden	69
2.2.6.2. Enzyminkubation und weitere Untersuchungen	69
2.2.7. Fokussierung von Apoprotein-haltigen Extrakten	70
2.2.7.1. Fokussierung von Extrakten aus Gabaculin- inkubierten Keimlingen	70
2.2.7.2. Fokussierung des über in vitro Translation und Immunpräzipitation gewonnenen Apoproteins	72
2.3. Abschließende Diskussion	78
2.3.1. Unterschied Chromoprotein - Apoprotein	78
2.3.2. Unterschied Pr - Pfr	81
2.3.3. Ursachen der Heterogenität	83
III. Zusammenfassung	85
IV. Material und Methoden	87
1. Geräte	87
1.1. Photometer, Belichtungseinrichtung	87
1.2. Durchflußphotometer, Fraktionssammler	87
1.3. Zentrifugen	87
2. Chemikalien	88
3. Aufreinigung von Phytochrom	88
3.1. Sicherheitsvorkehrungen	88
3.2. Anzucht des Pflanzenmaterials	88
3.3. Reinigung von Phytochrom	89
3.3.1. Puffer für die Aufreinigung	89
3.3.2. Polyethylenimin-Fällung	90
3.3.3. Ammoniumsulfat-Fällung	90
3.3.4. Hydroxylapatit-Chromatographie	90
3.4. Reinigung durch selektive Lösung von Fremdproteinen	91
3.5. Polyvinylpyrrolidon-Aufreinigung	92

4. Markierung mit δ -Aminolävulinsäure	92
4.1. Extraktion der markierten Keimlinge und Pepsinabbau	93
4.2. Auftrennung des Chromopeptids aus dem Pepsinabbau	94
4.3. Bestimmung der ^{14}C -Aktivität	94
4.4. Markierung mit $[1-^{14}\text{C}]$ oder $[5-^{14}\text{C}]2\text{-Oxoglutarat}$	95
5. In Vivo Inkubation von Avena Keimlingen mit Gabaculin	95
5.1. Inkubation und Extraktion	95
6. Spektralphotometrische Bestimmung der Phytochrom-Konzentration und Reinheit	96
7. Bestimmung des Gesamtphytochromgehalts über SDS-Polyacrylamid- gelelektrophorese und anschließender Immunoblotanalyse	97
8. Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrocel- lulose (Western Blot)	98
9. Immunoblot	99
10. Transfer von Proteinen aus Agarose-Gelen auf Nitrocellulose	100
11. Proteolytischer Abbau von Gabaculin-behandelten Keimlings- extrakten	101
12. Trennung von Proteinen durch Polyacrylamidgelelektrophorese	101
12.1. Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen	104
12.2. Native Gelelektrophorese	105
13. Isoelektrische Fokussierung (IEF)	106
13.1. Agarose-Fokussierungs-Gele (AIEF)	106
13.1.1. Gießen des Fokussierungs-Gels	106
13.1.2. Quellen der Gele	107
13.1.3. Trocknen der Geloberfläche	108
13.1.4. Elektrodenlösungen und Probenauftrag	108
13.1.5. Fokussierungs-Lauf	109
13.1.6. Fixieren, Trocknen und Färben des Gels	110
13.2. Polyacrylamid-Fokussierungs-Gele (PAGIEF)	111
13.2.1. Gießen der Gele	111
13.2.2. Trocknen von Polyacrylamid-Gelen	112
13.3. Bestimmen des pH-Gradienten	112
14. Zweidimensionale Auftrennung von Proteinen	113
15. Proteolytische Abbaumethoden zur Spaltstellen-Markierung	114
15.1. Abbau durch Kochen in SDS-haltigen Probenpuffer	114
15.2. Abbau durch Inkubation mit Ameisensäure	114
15.3. Abbau durch V-8 Protease	115
15.4. Abbau durch Trypsin	115

16. Enzymatische Testverfahren auf posttranslationale Modifikationen und Chromophornachweis	115
16.1. Inkubation mit alkalischer Phosphatase	115
16.2. Inkubation mit Phosphodiesterase	116
16.3. Inkubation mit Neuraminidase	116
16.4. Chromophornachweis	116
17. In vitro Translation und Immunpräzipitation	117
17.1. Isolation von Gesamt-RNA aus Haferkeimlingen	117
17.2. Oligo-dT-Cellulose-Chromatographie	118
17.3. In vitro Translation	119
17.4. Immunpräzipitation des Pr-Apoproteins aus den in vitro Translationsansätzen	120
17.5. Autoradiographie	121
17.5.1. Polyacrylamid-Gele	121
17.5.2. Agarose-Gele	121
V. Literaturverzeichnis	122

I. Einleitung

1. Phytochrom ein Sinnespigment in Pflanzen

1.1. Allgemeine Eigenschaften von Phytochrom

Pflanzen nutzen Licht auf ganz verschiedene Weise. Sie beziehen zum einen ihre Energie zur Photosynthese daraus, empfangen zum anderen dadurch eine Vielzahl von Informationen. So sind sie in der Lage, die Menge, die spektrale Verteilung (die Qualität), die Richtung und die Dauer des Lichts zu bestimmen. Befähigt werden sie dazu durch den Besitz von sensorischen Pigmentmolekülen, die im Gegensatz zum Blattfarbstoff Chlorophyll, das der Energieversorgung dient, nur in geringen Konzentrationen vorkommen.

Höhere Pflanzen weisen dabei mindestens 3 unterschiedliche Photorezeptoren auf: Protochlorophyllid, Phytochrom und einen oder mehrere Blaulichtrezeptoren, auch als Cryptochrome bezeichnet, die, verglichen mit den den anderen beiden Pigmenten bisher nur sehr unvollständig charakterisiert werden konnten (Tobin und Silverthorne, 1985, Briggs und Iino, 1983). Phytochrom nun hat einen entscheidenden Anteil bei der Steuerung von Entwicklungs-, Differenzierungs- und Regulationsprozessen in höheren Pflanzen (Shropshire und Mohr, 1983). Es eignet sich in einzigartiger Weise dazu, die spektrale Zusammensetzung des Lichts zu registrieren, wobei speziell das Energieverhältnis zwischen 2 schmalen Bereichen des Spektrums, bei Hellrot (666 nm) und Dunkelrot (730 nm) gemessen wird. Diese Eigenschaften des Phytochroms werden durch sein photochemisches Verhalten begründet: Die Absorption von hellrotem Licht (HR: $\lambda_{\max} = 666 \text{ nm}$) wandelt das Molekül in eine Form um, die dann bevorzugt auf dunkelrotes Licht (DR: $\lambda_{\max} = 730 \text{ nm}$) anspricht, und umgekehrt wandelt die Absorption von dunkelrotem Licht das Molekül wieder in die Ursprungsform zurück. Die Form, in der Phytochrom vorliegt, wird also durch die spektrale Zusammensetzung des Lichts bestimmt. Als Pr (P = Phytochrom, r = red = rot) wird dabei im Allgemeinen diejenige Form definiert, die HR absorbiert, in der

Pflanze im Dunkeln synthetisiert wird und als physiologisch unwirksam betrachtet wird (Pratt, 1982). Als Pfr (P = Phytochrom, fr = far red = dunkelrot) wird jene Form bezeichnet, die DR absorbiert. Sie wird als die physiologisch aktive Form des Chromoproteins angesehen, die die Reaktionen der Pflanze ermöglicht.

Wodurch nun die Phytochrom-Photokonversion mit den physiologischen und biochemischen Reaktionen der Pflanze verknüpft ist, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Offen ist auch weiterhin die Frage, ob diesbezüglich ein Primärmechanismus, der direkt durch die Photoumwandlung Pr-Pfr hervorgerufen wird, existiert, oder aber mehrere unterschiedliche Wege beschritten werden. Einige physiologische Antworten der Pflanzen, wie zum Beispiel die Chloroplastendrehung bei *Mougeotia* (Haupt, 1982) oder die Blättchenbewegung bei *Mimosa pudica* (Fondeville et al., 1966) erfolgen sehr schnell, so daß eine phytochromgesteuerte Aktivierung oder Inaktivierung von Genen dafür nicht verantwortlich sein kann. Derartige Effekte könnten durch reversible Änderungen von Membraneigenschaften erklärt werden (Marmé, 1977, Roux, 1986). Andererseits ist bei vielen anderen pflanzlichen Photoreaktionen, die über Phytochrom beeinflußt werden, eine Genregulation, wie sie von Mohr bereits 1966 postuliert wurde, nachgewiesen worden. So wird die Biosynthese einer Vielzahl von Enzymen durch Phytochrom auf der Transkriptionsebene beeinflußt. Als Beispiel seien hier die kleine Untereinheit der Ribulosebisdiphosphat-Carboxylase (SSU) und die Protochlorophyllid-Oxidoreduktase aufgeführt (zusammengefaßt bei Sharma, 1985). Nichtzuletzt übt Phytochrom auch eine autoregulatorische Kontrolle über die cytoplasmatische Konzentration der eigenen mRNA aus (Colbert et al., 1985).

Phytochromabhängige Effekte können weiterhin nach der Art ihrer Induktion in 3 Kategorien eingeteilt werden (Kronenberg und Kendrick, 1986). Man unterscheidet VLFR- (very low fluence responses), LFR- (low fluence responses) und HIR-Reaktionen (high irradiance responses).

HR/DR-reversible Photoreaktionen der klassischen Art, wie etwa die Blühinduktion bei höheren Pflanzen und auch die Chloroplastendrehung bei *Mougeotia* werden den LFR-Reaktionen zugerechnet. Kennzeichnend für diesen Typus ist, daß die Reaktion von der zuletzt eingestrahlten Lichtqualität abhängig ist (HR oder DR), für

eine Induktion ein großer Anteil an Pfr, wenn auch nur für kurze Zeit, vorliegen muß und dazu ein Photonenfluß von $1 - 1000 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ an hellrotem Licht benötigt wird. Die Folge einer LFR-Induktion sind zum einen photoreversible Photomodulationen, die wiederholt durch DR-Bestrahlung rückgängig zu machen sind (Chloroplastendrehung bei *Mougeotia*), zum anderen aber auch irreversible Photodifferenzierungen, die einige Minuten nach der Lichtinduktion nicht mehr revertierbar sind (Blühinduktion bei höheren Pflanzen).

VLFR-Reaktionen zeichnen sich dadurch aus, daß sie nicht reversibel sind und nur einen Photonenfluß von $10^{-4} - 10^{-2} \mu\text{mol}/\text{m}^2$ an HR erfordern. Diese sehr empfindliche Reaktion kann auch schon durch "grünes Sicherheitslicht" und auch durch DR-Bestrahlung ausgelöst werden. Dies erklärt man sich dadurch, daß auch im Dunkeln gebildetes Pr diese Wellenlängen, wenn auch sehr schwach, absorbiert und durch Photokonversion geringe Mengen an Pfr entstehen können, die schließlich die VLFR-Reaktion auslösen. Ein Beispiel für diesen Typus ist die lichtinduzierte Hemmung des Mesokotyl-Wachstums, und die gleichzeitige Förderung des Koleoptilen-Wachstums bei Haferkeimlingen (Mandoli und Briggs, 1984).

HIR-Reaktionen benötigen dagegen vergleichsweise sehr lange Bestrahlungszeiten (mehrere Stunden) mit hoher Intensität, sind weniger von der Pfr-Konzentration als von der Photonenflußrate ($\mu\text{mol Photonen}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$) abhängig und nicht reversibel. Bei etiolierten Pflanzen ist eine HIR-Reaktion durch DR-Bestrahlung mit einem Wirkungsmaximum bei 716 nm feststellbar (Hartmann, 1966). Das Paradoxon, daß hier scheinbar Pr physiologisch aktiv ist, wird folgendermaßen erklärt (Kendrick und Kronenberg, 1986): Lang andauernde HR-Bestrahlung führt zu einer hohen Pfr-Konzentration, die aber während der Dauer der Belichtung durch proteolytischen Abbau, der speziell Phytochrom in der Pfr-Form betrifft, rasch verschwindet. Dagegen wird bei DR-Bestrahlung nur eine sehr geringe Menge des Phytochroms in die Pfr-Form umgewandelt. Aus dem verbleibenden, stabilen Anteil an Pr kann ständig Pfr über die Photokonversion nachgeliefert werden und so dem Abbau des Pfr entgegengewirkt werden. Daraus ergibt sich über die notwendige, lange Dauer der Bestrahlung eine höhere, physiologisch aktive Pfr-Konzentration als bei HR-Belichtung. Nach dem Deetiolement kann dagegen eine HR-HIR beobachtet werden. Dies wird dadurch erklärt, daß nach langer

Belichtung der Anteil an labilem Dunkelphytochrom abgebaut worden ist, und der verbleibende Rest aus einem anderen, lichtstabilem Phytochrom gebildet wird, das auch in der Pfr-Form überdauert. Neben HR und DR ist aber auch blaues Licht in allen untersuchten HIR-Reaktionen wirksam. Daher wird auch der Einfluß eines Blaulichtrezeptors zusätzlich zu Phytochrom diskutiert. Beim Deetiolement von Pflanzenkeimlingen wirken HIR- und LFR-Reaktionen synergistisch und verursachen die bekannten morphogenetischen Änderungen.

Aus dieser unterschiedlichen Funktionsweise des Phytochroms, was Lichtqualität und -Quantität betrifft und der großen photomorphogenetischen Wirkungsbreite ist ersichtlich, daß Phytochrom mit seiner außerordentlichen Eigenschaft der Photokonversion zwischen der Pr- und der Pfr-Form am Anfang eines sehr komplexen Regulationssystems steht.

1.2. Biosynthese des Chromoproteins

Der Gehalt an photoreversiblen Phytochrom nimmt während des Wachstums und der Entwicklung von etiolierten Keimlingen zu (Correll und Shropshire, 1968). Es erfolgt dabei eine *de novo*-Synthese in der Pr-Form (Quail et al., 1973) bis ein bestimmter Gehalt erreicht ist, der durch ein Gleichgewicht von Synthese und Destruktion von Pr bestimmt wird. Zum vollständigen Aufbau des Phytochrom-Holoproteins tragen 2 Stoffwechselwege bei, die die Biosynthese des Apoproteins und die Biosynthese des Chromophors umfassen. Zusätzlich ist die kovalente Bindung des Chromophors an die Polypeptidkette des Apoproteins erforderlich. Das Apoprotein erwies sich als kerncodiert und konnte über *in vitro* Translation erhalten werden (Gottmann und Schäfer, 1982, sowie Bolton und Quail, 1982). Es wies, über SDS-PAGE aufgetrennt, die gleiche Mobilität auf wie natives 124 kD Chromoprotein, ein Einfluß des Chromophors mit einem Molekulargewicht von 582 Dalton konnte nicht festgestellt werden. Kurz darauf wurde auch nachgewiesen, daß in Hafer Phytochrom in der Pfr-Form die Expression seiner Gene autoregulatorisch erniedrigt (Colbert et al., 1983, 1985, sowie Gottmann und Schäfer, 1983). Dieser Effekt wurde inzwischen auch für dikotyle Pflanzen wie Erbse (Otto et al., 1984) und auch

Zucchini (Lissemore et al., 1987) bestätigt. In Hafer konnten zudem mindestens 4 verschiedene Phytochromgene gefunden werden. Dabei wurde auch die Nucleotidsequenz von 2 Genen vollständig aufgeklärt (Hershey et al., 1985).

Dagegen ist über die Synthese des Chromophors, des Phytochromobilins noch sehr wenig bekannt. Er gehört zur Gruppe der Gallenfarbstoffe, deren Grundgerüst durch 4 Pyrrolringe charakterisiert ist, die linear über 3 Methinbrücken verknüpft sind. Der Chromophor ist mit dem Protein durch eine Thioetherbindung über die Aminosäure Cystein verbunden (Rüdiger et al., 1980, 1983, Lagarias und Rapoport, 1980). Bei der Biosynthese von Phytochromobilin wird angenommen, daß sie ähnlich wie die des chemisch nah verwandten Phycocyanobilins, des Chromophors von Phycocyanin, einem akzessorischen Pigment der Photosynthese in Blau- und Rotalgen verläuft. So soll der Syntheseweg des Chromophors über die Zwischenstufen δ -Aminolävulinsäure, Protoporphyrin, Häm und Biliverdin IXa verlaufen (Elich und Lagarias, 1987). Ein direkter Nachweis fehlt jedoch bisher, nur der Einbau von δ -Aminolävulinsäure in den Chromophor wurde bisher beschrieben (Bonner, 1967, Elich und Lagarias, 1987). δ -Aminolävulinsäure selbst kann über 2 verschiedene Stoffwechselwege synthetisiert werden: über die Kondensation von Succinyl-CoA und Glyzin, katalysiert durch das Enzym ALA-Synthetase oder aber über den sogenannten C-5 Weg, wobei das Kohlenstoffskelett von Glutamat oder einer nahe verwandten Verbindung während der Umwandlung zu δ -Aminolävulinsäure intakt bleibt (Castelfranco und Beale, 1983). Versuche mit einem Hemmstoff deuten darauf hin, daß die Biosynthese von δ -Aminolävulinsäure als Vorstufe für den Chromophor über den C-5 Weg verläuft (Gardner und Gorton, 1985), ein direkter Nachweis konnte jedoch ebenfalls nicht erbracht werden. Auch über die Art und Weise, wie und wo der Chromophor mit dem Apoprotein zum vollständigen Holoprotein verknüpft wird ist bisher nichts bekannt.

1.3. Unterschiedliche Phytochrome

Bereits bevor Hershey et al. (1985) der Nachweis gelang, daß in etioliertem Hafer mindestens 4 verschiedene Gene exprimiert werden und damit auch möglicherweise unterschiedliche Proteinisoformen in der Zelle vorliegen, gab es Untersuchungen, die auf die Existenz multipler Phytochromspezies in Pflanzengewebe hinweisen. Bei in vivo spektrophotometrischen Messungen konnten unterschiedliche Kinetiken bei Phototransformationen und auch bei der Dunkeldestruktion von Pfr gemessen werden, woraus die Existenz von mindestens 2 differenten Phytochrompopulationen gefolgert wurde (zusammengefaßt bei Takimoto und Saji, 1984). Auch aus immunochemischen Untersuchungen über die Kreuzreaktivität von membranassoziiertem und löslichem Phytochrom in Haferextrakten wurde auf immunologisch unterschiedliche Phytochromspezies in etioliertem Gewebe geschlossen (Jordan et al., 1984). Ebenfalls bei Hafer konnten zwischen Phytochrom aus etiolierten und grünen Keimlingen sowohl Abweichungen im Absorptionsspektrum als auch im immunologischen Verhalten festgestellt werden (Shimazaki et al., 1983, Thomas et al., 1984, Tokuhisa et al., 1985, Shimazaki und Pratt, 1985). Nach Tokuhisa et al. soll sich das Phytochrom aus grünem Gewebe auch im Molekulargewicht, das mit 118 kD angegeben wurde, von der Spezies aus etioliertem Gewebe mit 124 kD unterscheiden (Tokuhisa et al., 1985). Weitere Untersuchungen lassen darauf schließen, daß beide Isoformen nebeneinander in quellenden Haferembryonen vorliegen, während die Menge der 124 kD Spezies jedoch nach 72 h Keimung über 200 fach ansteigt, zeigt die 118 kD Spezies nur eine 2 fache Zunahme (Tokuhisa et al., 1987). Zieht man nun in Betracht, daß Phytochrom aus etiolierten Pflanzen unter physiologischen Bedingungen als Dimer auftritt (Jones und Quail, 1986), sind auch heterologe Kombinationen denkbar, die die Anzahl von möglichen Isoformen noch vergrößern könnten. Ob diese differenten Spezies auch für unterschiedliche Phytochromreaktionen verantwortlich zu machen sind, konnte allerdings bisher nicht aufgeklärt werden.

1.4. Aufgaben- und Problemstellung

Ziel dieser Arbeit war es, durch Markierungsexperimente mit radioaktiven Vorstufen Aufklärung über den Syntheseweg des Chromophors zu erhalten.

Über eine analytische Trennung von Apo- und Chromoprotein durch isoelektrische Fokussierung und Detektion der Proteine sollte in weiteren Experimenten auch Informationen über den Ort der Chromophoranheftung gewonnen werden. Dazu sollten Apoprotein-haltige Extrakte über in vitro Translation oder Hemmstoffinkubation von Keimlingen angereichert werden.

Zudem sollte es die Methode der isoelektrischen Fokussierung zulassen, in Gelen mit und ohne denaturierende Agenzien auftretende, mögliche Ladungsunterschiede zwischen der Pr- und der Pfr-Form im nativen Zustand des Moleküls aufzutrennen. Auch wäre es denkbar, daß auf diese Weise Phytochromisoformen direkt nachgewiesen und isoliert werden könnten.

II. Ergebnisse und Diskussion

1. Untersuchungen zur Chromophor- und Proteinbiosynthese von Phytochrom

1.1. In Vivo-Markierung des Pr-Chromophors mit δ -Aminolävulinsäure und mit $[1-^{14}\text{C}]$ oder $[5-^{14}\text{C}]2\text{-Oxoglutarat}$

1.1.1. Markierung mit δ -Aminolävulinsäure

δ -ALA stellt eine sehr spezielle Vorstufe für Tetrapyrrole dar, weshalb bei Markierungsexperimenten mit ^{14}C - δ -ALA eine hohe Einbaurate zu erwarten ist. Deshalb wurden zunächst mit ^{14}C - δ -ALA Versuche unternommen, um die Inkorporationsbedingungen für die folgende Verwendung von $[1-^{14}\text{C}]$ oder $[5-^{14}\text{C}]2\text{-Oxoglutarat}$ als aktive Vorstufen zu optimieren.

Dazu wurden entspelzte Haferkörner in Plastik-Petrischalen ausgesät und bei hoher Luftfeuchtigkeit im Brutschrank im Dunkeln inkubiert. Es kamen verschiedene Applikationstechniken zum Einsatz:

- a) die entspelzten Körner wurden am Ansatztag ausgerichtet ausgesät und jeder Embryo mit Inkubationsmedium betropft.
- b) die entspelzten Körner wurden ausgerichtet ausgesät, am 1. Tag im Brutschrank inkubiert und dann erst am 2. Tag wie unter a) mit Medium auf den Embryo betropft und erneut inkubiert.
- c) die entspelzten Körner wurden am Ansatztag mit δ -ALA-Lösung vorgequollen und dann mit dem Embryo nach oben ausgerichtet, ausgesät.

Die Ernte, Extraktion und Aufreinigung des Chromopeptids erfolgte wie unter "IV Material und Methoden 4." beschrieben.

Die Aktivität wurde mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt. Das Ergebnis zeigt Tabelle 1.

TABELLE 1: Einbau von 5-Amino [4-¹⁴C] Lävulinsäure in die Chromopeptidfraktion von Phytochrom in 4-tage-alten etiolierten Haferkeimlingen bei unterschiedlichen Applikationstechniken der radioaktiv markierten δ -ALA.

	a am Ansatztag Embryo betropft	b am 2.Tag Embryo betropft	c Körner mit Medium vorgeqollen
eingesetzte Aktivität	2.59 MBq	1.46 MBq	1.46 MBq
Zahl der Keimlinge	700	700	700
Frischgewicht	17.5 g	12.5 g	10.5 g
RE-II	52 kBq	64 kBq	1.15 kBq
Gesamt-Säuleneluat	1234 Bq	1851 Bq	193 Bq
Pr-Peptidfraktion	521 Bq	762 Bq	95 Bq
% Aktivität Pr-Pept. vom Gesamt-Säuleneluat	42 %	41%	32 %
Mol Chromophor in Pr-Fraktion	1 nMol	1 nMol	0.9 nMol
spez.Aktivität pro μ Mol Chromphor	521 kBq	762 kBq	107 kBq
spez.Aktivität der δ -ALA	2.04 MBq/ μ Mol	2.04 MBq/ μ Mol	2.04 MBq/ μ Mol

Demnach scheint Methode b) am besten zu sein. Hier wird die höchste spezifische Aktivität erreicht und auch der Kieselgelsäulenauftrag zeigt die höchste Radioaktivität.

Nach einem Tag Quellung der Körner wird die δ -ALA nach diesen Ergebnissen besonders gut aufgenommen. Setzt man voraus, daß die Aktivität nur im Chromophor lokalisiert ist, wäre nach der gemessenen spezifischen Aktivität zu erwarten, daß im statistischen

Mittel jeder 3. Chromophor mit einem ^{14}C - δ -ALA Molekül markiert wurde, was einer ziemlich hohen Einbaurrate entsprechen würde.

Die Anwendung von aktiver δ -ALA zur Markierung von Phytochrom ist früher nur von Bonner (1967) und kürzlich von Elich und Lagarias (1987) beschrieben worden. Elich und Lagarias unternahmen ihre Versuche aber mit GABA (Gabaculin) vorbehandelten, etiolierten Avena Keimlingen.

Die hier geschilderte Methode lieferte allerdings kein reines Chromopeptid. Um die Verluste möglichst gering zu halten, wurde von einer Säulenchromatographie über Hydroxylapatit abgesehen. Immerhin war es derart möglich 50-90% des im Rohextrakt II spektral zu erfassenden Phytochroms in die aufgereinigte Peptidfraktion zu überführen, und als Chromopeptid zu erhalten.

1.1.2. Markierung mit $[1-^{14}\text{C}]$ oder $[5-^{14}\text{C}]$ 2-Oxoglutarat

Es werden allgemein für die Biosynthese von δ -ALA 2 Wege beschrieben, die im Weiteren als C-5 Weg und Shemin-Weg aufgeführt werden. Abbildung 1 zeigt beide Stoffwechselwege. Die Kohlenstoffatome von 2-Oxoglutarat an 1. und 5. Position sind mit den Zeichen # und * gekennzeichnet.

Succinyl CoA

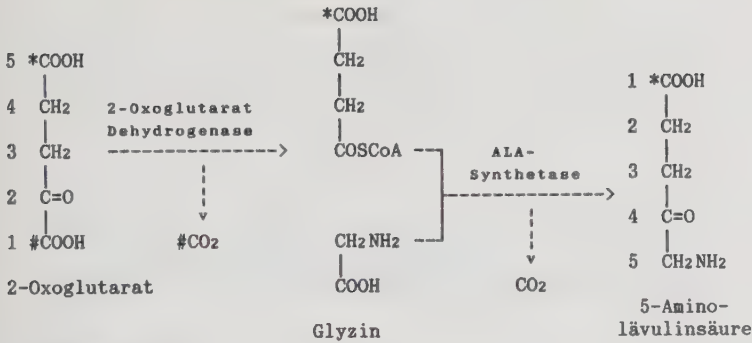
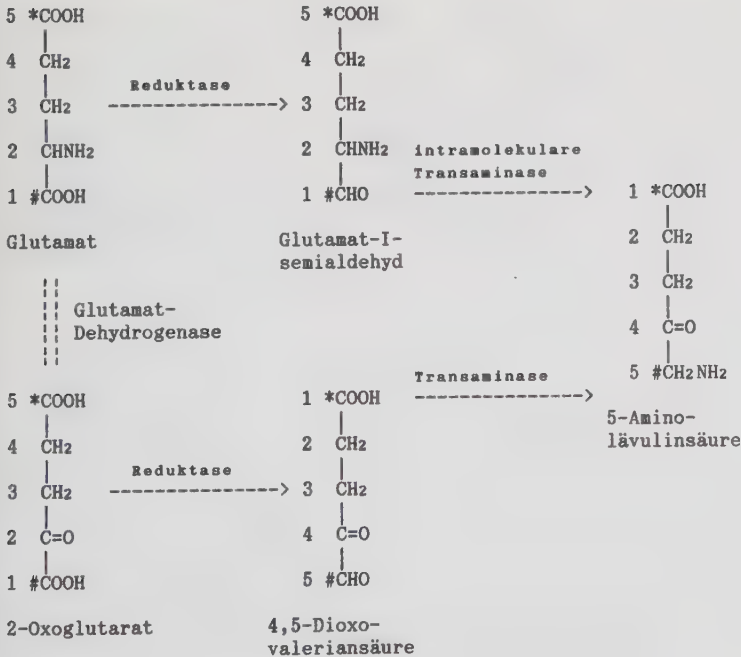
A) Shemin-wegB) C-5 Wege

Abb. 1

A) Shemin-Weg

B) C-5-Wege

Bei der Markierung entweder mit $[1-^{14}\text{C}]$ oder $[5-^{14}\text{C}]2\text{-Oxoglutarat}$ sollte eine Unterscheidung zwischen einer Beteiligung des Shemin-Weges oder des C-5-Weges möglich sein.

Shemin-Weg: $[1-^{14}\text{C}]2\text{-Oxoglutarat}$ sollte nicht in $\delta\text{-ALA}$ und damit nicht ins Chromopeptid eingebaut werden. Für $[5-^{14}\text{C}]2\text{-Oxoglutarat}$ wäre eine Markierung zu erwarten.

C-5-Weg: Beide Metaboliten sollten eingebaut werden und das Chromopeptid markieren. Es erfolgt im Gegensatz zum Shemin-Weg keine Decarboxylierungsreaktion.

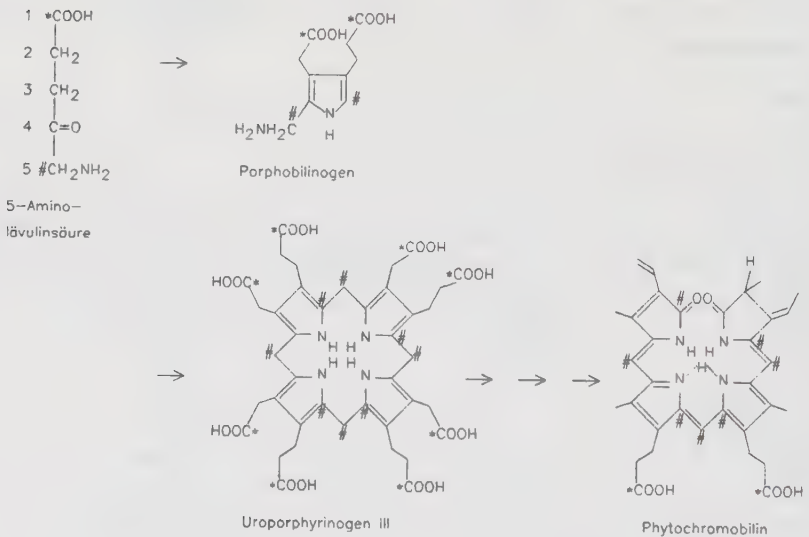


Abb. 2

$\delta\text{-ALA} \rightarrow$

Porphobilinogen $\rightarrow$

Uroporphyrinogen III

Betrachtet man weiterhin den Syntheseweg bis zum Phytychromobilin, so verläuft er ab $\delta\text{-ALA}$ gleich.

Beim C-5-Weg sind im Endprodukt 7 $[1-^{14}\text{C}]2\text{-Oxoglutarat-C-Atome}$ zu erwarten, eines wird bei der Ringöffnung zum Phytychromobilin entfernt. Dagegen sollten nur 2 $[5-^{14}\text{C}]2\text{-Oxoglutarat-C-Atome}$ am Phytychromobilin verbleiben, die restlichen werden durch

Decarboxylierungsreaktion entfernt.

Noch einmal kurz zusammengefaßt:

Shemin-Weg: [1- ^{14}C]2-Oxoglutarat sollte den Chromophor nicht markieren.

Bei [5- ^{14}C]2-Oxoglutarat sind maximal 2 C-Atome im Chromophor markierbar.

C-5-Weg: [1- ^{14}C]2-Oxoglutarat könnte maximal 7 C-Atome im Chromophor markieren,
[5- ^{14}C]2-Oxoglutarat dagegen höchstens 2.

Die Inkubationsversuche und Extraktionen wurden analog zu den δ -ALA-Versuchen wie unter b) (s.1.1.1) beschrieben, durchgeführt. (Der Embryo wurde also erst am 2. Tag betropft, und die Ernte erfolgte nach 4 Tagen Inkubation im Brutschrank.)

Insgesamt sind 3 Parallelversuche durchgeführt worden. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 2, in der zum Vergleich auch noch die δ -ALA-Daten aufgeführt sind.

	Maß- Ein- heit	^{14}C -ALA	[1- ^{14}C] und [5- ^{14}C]2-Oxoglutarat					
			1'	5'	1'	5'	N 1'	N 5'
eingesetzte Aktivität	MBq	1.46	0.93	0.93	0.93	0.93	1.85	1.85
Zahl der Keimlinge		700	700	700	700	700	1000	1000
Frischgewicht	g	12.5	9.2	10	8	8.2	17.2	17.2
RE-II	Bq	64000	2738	7400	3700	5180	4810	14060
Gesamt-Säuleneluat	Bq	1432	185	518	233	352	322	1100
Pr-Peptid-fraktion	Bq	762	15	37	22	43	48	126
Aktivität Pr-Pept. vom Gesamt-Säuleneluat	%	41	8	8	10	14	16	12
Mol Chromophor in Pr-Fraktion	nMol	1	0.5	0.5	0.4	0.34	1.14	1.35
spez. Aktivität pro μMol Chromophor	kBq/ μMol	762	30	74	55	126	42	93
spez. Aktivität des Markers	MBq μMol	2.04	562	562	562	562	562	562

TABELLE 2: Einbau von [1- ^{14}C] oder [5- ^{14}C]2-Oxoglutarat in die Chromopeptidfraktion von Phytochrom in 4-tage-alten etiolierten Haferkeimlinge. Zum Vergleich sind auch noch die Werte für die Markierung mit ^{14}C - δ -ALA aufgeführt. Bei den letzten beiden Versuchen mit [1- ^{14}C]-[5- ^{14}C]2-Oxoglutarat (mit N bezeichnet) enthielt das Inkubationsmedium zusätzlich NH_4NO_3 (Konz. 1.6 mM).

Da die spezifische Aktivität der eingesetzten Markiersubstanz 2-Oxoglutarat geringer war als bei der verwendeten δ -ALA, war zu erwarten, daß die zu erreichende spezifische Aktivität des Chromopeptids mindestens auch um diesen Faktor kleiner sein würde. 2-Oxoglutarat stellt keine derart spezifische Vorstufe für Tetrapyrrole dar, wie δ -ALA, ist Metabolit im Tricarbonsäurezyklus und

in der Aminosäuresynthese.

So ist die Prozent-Aktivität des Pr-Peptids von Gesamt-Säuleneluat sehr viel geringer als bei der Verwendung von δ -ALA als Marker, der absolute Wert auch kleiner.

Der Grund dürfte darin liegen, daß auch Aminosäuren in den Peptiden markiert sind, die über 2-Oxoglutarat als Vorstufe synthetisiert werden.

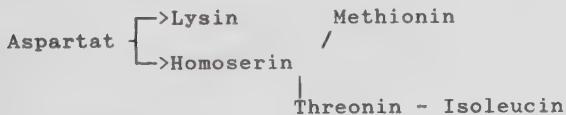
Nach Richter (1982) stellt sich das derart dar:



Nach Decarboxylierung von 2-Oxoglutarat zu Succinat können noch mehr Aminosäuren markiert sein.



Oxalacetat bildet das C-4 Grundgerüst für :



Dies dürfte der Grund für den geringen Anteil des Pr-Peptids am Gesamt-Säuleneluat gegenüber δ -ALA-Versuchen sein, die unterschiedliche spezifische Aktivität der Marker sollte darauf keinen Einfluß haben. Die spezifische Aktivität pro μMol Chromophor bei den 2-Oxoglutarat-Versuchen dürfte noch geringer sein als gemessen, da auch Aminosäuren des Peptids markiert sein könnten. Als Beispiel sei das 11-er Peptid dargestellt (Lagarias und Rapoport, 1980, Fry und Mumford, 1971).

In diesem Peptid sind bereits 3 Aminosäuren aus der Glutamat-Familie enthalten:

Leu - Arg - Ala - Pro - His - Ser - Cys - His - Leu - Gln - Tyr
 /
 S - Chromophor

Vergleich [1-¹⁴C] und [1-¹⁴C]2-Oxoglutarat

Durchgehend bei allen 3 Versuchen wird [1-¹⁴C]2-Oxoglutarat schlechter eingebaut als [5-¹⁴C]2-Oxoglutarat.

Nach der Vorgabe sollte dies für den Shemin-Weg sprechen. Aber der schlechtere Einbau ist bereits im RE-II und beim KG-Auftrag zu beobachten.

Auf dieses Resultat hat auch Zugabe von NH₄NO₃ keinen Einfluß, wie in Tabelle 2, 3. Versuch, zu sehen ist. Die %-Aktivität Pr-Peptid vom Gesamt-Säuleneluat, das sich bei allen Versuchen auf 90% des Auftrags belief, liegt auch innerhalb der gleichen Größenordnung, was nicht für den Shemin-Weg spricht, da sonst bei [1-¹⁴C]2-Oxoglutarat ein geringerer Anteil zu erwarten wäre.

Die spezifische Aktivität pro µMol Chromophor weist bei allen 3 Versuchen ungefähr den gleichen Faktor auf:

[5-¹⁴C]2-Oxoglutarat ± doppelt so hoch wie [1-¹⁴C]2-Oxoglutarat;

Vergleicht man die Aktivitäten der KG-Aufträge ergibt sich beim ersten und dritten Versuch ein ähnliches Verhältnis nur beim zweiten läßt sich eine leichte Diskrepanz beobachten, dessen Ursache nicht zu erklären war.

<u>VERGLEICH:</u>	<u>Aktivität des KG-Auftrags</u>	<u>spezifische Aktivität pro µMol Chromophor</u>
-------------------	----------------------------------	--

1. Versuch:	5' : 1' = 2.8	5' : 1' = 2.5
2. Versuch:	5' : 1' = 1.5	5' : 1' = 2.26
3. Versuch:	5' : 1' = 3.44	5' : 1' = 2.27

Betrachtet man sämtliche Werte im Vergleich mit den bei 8-ALA-Markierung erzielten, stellt sich die Frage inwieweit der Chromo-

phor bei den 2-Oxoglutarat-Versuchen zur spezifische Aktivität der Chromopeptidfraktion beiträgt, und wodurch die generell geringere Inkorporationsrate von $[1-^{14}\text{C}]2\text{-Oxoglutarat}$ gegenüber $[5-^{14}\text{C}]2\text{-Oxoglutarat}$ bereits im Rohextrakt, sowie im KG-Auftrag zu erklären ist. Da sich dieses Mißverhältnis auch in der Pr-Peptidfraktion manifestiert, ist eher darauf zu schließen, daß es sich dabei hauptsächlich um eine unterschiedlich starke Markierung der Aminosäuren in den pepsinverdauten Peptiden der ursprünglichen Proteine, also auch des Pr-Chromoproteins, handelt.

Betrachtet man den Ablauf des Tricarbonsäurezyklus in den Mitochondrien der Pflanzenzelle, bietet sich für die beobachteten Verhältnisse eine Erklärung an.

Als direkter Metabolit des Citratzyklus kann exogenes 2-Oxoglutarat eingeschleust werden und wird im nächsten Schritt an 1'-Stelle durch den Multi-Enzym-Komplex der Oxoglutaratdehydrogenase oxidativ decarboxyliert zu Succinyl-Coenzym A. Während bei $[5-^{14}\text{C}]2\text{-Oxoglutarat}$ also das markierte C-Atom erhalten bleibt und erst beim nächsten Umlauf bei der Decarboxylierung von Isocitrat durch den oben erwähnten Reaktionsschritt als CO_2 verlorenggeht, ist dies bei $[1-^{14}\text{C}]2\text{-Oxoglutarat}$ gleich nach Eintritt in den Zyklus der Fall. Aus diesem Grund wurde beim letzten Versuch als Substrat für das Enzym Glutamin-Synthetase



Ammoniumnitrat zum Markierungstropfen für den Embryo gegeben, um über den GOGAT-Weg (Glutamin: 2-Oxoglutarat-Aminotransferase)



oder über den direkten Weg mittels Glutamatdehydrogenase



das markierte 2-Oxoglutarat in Glu umzuwandeln und so gegen den

Abbau im TCA-Zyklus zu stabilisieren.

Tabelle 2 zeigt, daß auch auf diese Weise kein höherer Einbau von $[1-^{14}\text{C}]2\text{-Oxoglutarat}$ gegenüber $[5-^{14}\text{C}]2\text{-Oxoglutarat}$ zu erreichen war. Tritt also ein Großteil des exogen zugegebenen $[1-^{14}\text{C}]$ oder $[5-^{14}\text{C}]2\text{-Oxoglutarat}$ in den TCA-Zyklus ein, ist auch noch ein weiterer Effekt denkbar, der die theoretisch zu erwartende und bereits besprochene Markierungsverteilung im Chromophor für den C-5-Weg verfälscht. $[1-^{14}\text{C}]2\text{-Oxoglutarat}$ wird gleich nach dem Einschleusen decarboxyliert und verliert sein aktives ^{14}C -Atom als CO_2 .

$[5-^{14}\text{C}]2\text{-Oxoglutarat}$ durchläuft diese Reaktion ohne Verlust des markierten Atoms, das nun bei Succinat, einem Molekül ohne asymmetrischem Zentrum zu 50% an 1' oder 4' Stelle stehen kann.

Diese Positionen werden beim Fortlauf des Zyklus bis zum Isocitrat eingehalten. Bei der Oxidation und Decarboxylierung von Isocitrat zu 2-Oxoglutarat wird das C-Atom an 4' Stelle abgespalten, 1' bleibt erhalten. Letztendlich werden also 50% des $[5-^{14}\text{C}]2\text{-Oxoglutarat}$ nach einem vollständigen Durchlauf ohne Abzweigungen zu $[1-^{14}\text{C}]2\text{-Oxoglutarat}$ umgewandelt, das den Zyklus verlassen und in die Chromophorbiosynthese eintreten könnte. Tatsächlich konnten dies auch Porra, Klein und Wright (1983) für die Biosynthese von Chlorophyll in abgeschnittenen Maisblättern durch ^{13}C NMR-Spektroskopie nachweisen. Sie verwendeten dabei $[1-^{13}\text{C}]\text{Glu}$ als Marker-substanz, erhielten dafür die erwartete Anreicherung in den 4 Methinbrücken-C-Atomen sowie den 4 Pyrrol α -C-Atomen, für $[5-^{13}\text{C}]\text{-Glu}$ dagegen hauptsächlich in den 2 Carboxylgruppen C-13 und C-17 sowie 15% davon auf $[1-^{13}\text{C}]$ spezifischen Stellen (Methinbrücken, Pyrrol α -C-Atome).

Für die Verwendung von $[5-^{14}\text{C}]2\text{-Oxoglutarat}$ statt Glu dürfte der Anteil an "Recycling" zu $[1-^{14}\text{C}]2\text{-Oxoglutarat}$ noch höher sein, da dann zum Eintritt in den TCA-Zyklus der Deaminierungsschritt entfällt. Dieses "Recycling" führt zu einer höheren spezifischen Aktivität des Chromophors und verringert damit den Unterschied in Bezug auf die Markierung mit $[1-^{14}\text{C}]2\text{-Oxoglutarat}$, der theoretisch bei alleiniger Synthese über den C-5-Weg 2:7 betragen sollte. Porra, Klein und Wright (1983) fanden allerdings, daß die Isotopeninkorporationsraten für $[5-^{13}\text{C}]\text{Glu}$ die 2 Carboxylkohlenstoff-atome betreffend, sowie für $[1-^{13}\text{C}]\text{Glu}$ bezogen auf die 8 Ringkoh-

lenstoffatome gleich hoch waren. Das bedeutet, daß dort der Decarboxylierungseffekt von $[1-^{13}\text{C}]2\text{-Oxoglutarat}$ im TCA-Zyklus und die damit verbundene generell geringere Inkorporation von an 1' Stelle markierten Substrat gegenüber 5'-markiertem nicht auftrat. Dafür lassen sich mehrere Gründe aufführen:

- 1) Sie verwendeten $[1-^{13}\text{C}]\text{Glu}$, das nicht direkt in den TCA-Zyklus eingespeist werden kann.
- 2) Abgespaltenes $^{13}\text{CO}_2$ wird durch die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Reaktion refixiert und letztlich wieder zu $[1-^{13}\text{C}]2\text{-Oxoglutarat}$ umgewandelt, wozu Mais als C_4 -Pflanze fähig ist.
- 3) Die benutzten Blätter waren vor der Zugabe des markierten Substrats bereits 2 Stunden Weißlicht ausgesetzt und wurden dann erst nach weiteren 16 Stunden im Licht geerntet und extrahiert.

Das bedeutet, daß der Photosyntheseapparat (im Gegensatz zu etiolierten Pflanzen) bereits zumindest teilweise ausgebildet ist, Energie für den Stoffwechsel durch Photophosphorylierung bereitgestellt werden kann und nicht mehr nur durch Atmungskettenphosphorylierung (= aerobe Dissimilation) verfügbar ist.

Dagegen sind etiolierte Pflanzen auf diese Art der Energiegewinnung und damit auf einen hohen Umsatz im TCA-Zyklus angewiesen.

Ziel dieses Markierungsversuchs war ebenfalls der Einsatz von ^{13}C -markierten Isotopen nach den geschilderten ^{14}C -Vorversuchen.

Zusätzlich war die Chromophorabspaltung (Rüdiger et al., 1980) ein anschließender Chromsäureabbau (Rüdiger, 1969) und ^{13}C -NMR-Spektroskopie der dabei auftretenden Spaltprodukte vorgesehen. Wegen der geringen Einbauraten, der ungenügenden Reinheit des Chromopeptids und der oben geschilderten Problematik wurde jedoch davon abgesehen. Es läßt sich jedoch aus den ^{14}C -Ergebnissen erkennen, daß der Shemin-Weg zumindest nicht allein an der Chromophorbiosynthese beteiligt ist. Denn dann müßte, wie bereits erwähnt, der prozentuale Anteil der Aktivität des Pr-Peptids vom Gesamt-Säuleneluat bei $[1-^{14}\text{C}]2\text{-Oxoglutarat}$ niedriger sein als bei $[5-^{14}\text{C}]2\text{-Oxoglutarat}$.

1.2. In Vivo-Inkubation von Avena Keimlingen mit Gabaculin

Gabaculin (5-Amino-1,3-Cyclohexadienylcarboxylsäure) ist ein natürliches Produkt und wurde aus dem Kulturfiltrat von *Streptomyces toyacaensis* isoliert. Es ist ein irreversibler Inhibitor des Säugetierzyns 4-Aminobuttersäure-2-Oxoglutarat-Transaminase (Rando, 1977). Flint (1984) konnte zeigen, daß GABA die Chlorophyll-Biosynthese stark hemmt und führte dies ebenfalls auf die Inhibierung der Transaminase-Reaktion beim C-5-Weg der δ -ALA-Bildung zurück, da dieser Effekt durch ALA-Gaben von außen unterdrückt werden konnte. Zudem hemmt GABA nicht die ALA-Synthetase aus *Rhodospseudomonas spheroides*, beeinflusst demnach nicht den Shemin-Weg. Auch Untersuchungen zum Einfluß von GABA auf den Phytochromgehalt von etiolierten Keimlingen wurden durchgeführt (Gardner und Gorton, 1985, Jones et al., 1986, Elich und Lagarias, 1987) und sollten an dieser Stelle an Hafer überprüft und erweitert werden.

1.2.1. Hemmung der Chromophorbiosynthese durch Gabaculin

Ähnlich den ^{14}C -Markierungsversuchen, wurde die Testlösung, jeweils 5 μl pro Keimling, direkt auf den nach oben ausgerichteten Embryo aufgetragen und wie im Kapitel "Material und Methoden" unter Punkt 4. beschrieben, weiterbehandelt. Die Keimlinge wurden dann je nach Länge am 3. oder 4. Tag geerntet und extrahiert. Der Gehalt an Phytochromprotein wurde über $\Delta\Delta\text{A}$ -Messungen spektroskopisch im RE-II bestimmt, der Gesamtphytochromproteingehalt (Apo + Chromoprotein) dann nach Ammoniumsulfatfällung und Resuspension des Pellets in Resuspensionspuffer (= RE-III) über SDS-PAGE und anschließender Immunoblot-Analyse wie im Kapitel "Material und Methoden" unter Punkt 7. beschrieben, ermittelt. Parallel dazu wurden Keimlinge auch mit gesättigter Biliverdinlösung in H_2O , oder einer Kombination von Gabaculin und Biliverdin (Biliverdin bis zur Sättigung in 10 mM GABA gelöst) sowie 5 mM Lävulinsäurelösung (jeweils 5 μl pro Embryo) und H_2O dest. (ebenfalls 5 μl pro Embryo), wie bereits mit Gabaculin beschrieben behandelt und zur Analyse aufbereitet. Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse.

	Ein- heit	GABA Kont		GABA Kont		GABA Kont		BILI GABA		GABA Kont		LÄV
Zahl der Keimlinge		100	100	100	100	200	200	200	154	100	100	100
FG	g	0.64	0.74	1.94	3.26	4.57	9.74	9.47	3.54	0.6	0.83	0.53
Alter	Tage	3	3	4	4	4	4	4	4	3	3	3
Gesamt PE	mPE	2	24	3.5	63	9	141	97	6.8	3.8	22	14
spektrosk. Vergleich: PE/kg FG (ΔΔA-Mess)		3	32	1.8	19.3	2	14.6	10.3	1.92	6	26	24.5
immunolog. Vergleich: PE/kg FG		28.3	30.6	15.4	18.4	16.8	--	--	15.5	27	26	24
Gesamt PE	mPE	18.1	22.7	30	60	77	--	--	55	16	22	14

TABELLE 3: Die Wirkung von Gabaculin auf die Neusynthese von Phytochrom-Apoprotein und -Chromophor.

Haferkeimlinge wurden im Dunkeln entweder mit (=GABA) oder ohne Gabaculininkubation (=KONT) und nach der angegebenen Zeit geerntet und extrahiert, der Chromoproteingehalt wurde über $\Delta\Delta$ -Messungen spektroskopisch gemessen, der Gesamt-phytochromgehalt (Apo + Holoprotein) über Immunoblotanalyse ermittelt. Aufgeführt sind auch die Daten von Versuchen, bei denen die Keimlinge mit Biliverdinlösung (=BILI), Biliverdin + Gabaculin (=BILI/GABA), sowie mit Lävulinsäure (=LÄV) behandelt wurden.

1 mPE entspricht dabei der Menge Pr die bei einer $\Delta\Delta$ von 1 in 1 μ l enthalten ist, oder nach Quail (1986) 850 ng Pr-Protein.

Es sind die Daten von 4 voneinander unabhängigen Versuchsansätzen aufgeführt. Bei langsamerem Wachstum konnte erst nach dem 4. Tag geerntet werden, um auch alle angesäten Keimlinge zu erfassen. Deshalb schwankt auch der Phytochromgehalt pro kg Frischgewicht (PE/kg FG) unter den Kontrollen der verschiedenen Versuchen, er nimmt generell ab, je älter und damit je länger und schwerer die Keimlinge werden, was auch bei allen Ansaaten zur Phytochromisolierung im großen Maßstab beobachtet werden konnte. Maßgeblich sind also die Werte und der Vergleich mit der Kontrolle innerhalb eines Versuchsansatzes.

Vergleicht man nun den spektroskopisch, über $\Delta\Delta A$ -Messungen ermittelten Phytochromgehalt der jeweiligen Kontrollen mit dem der GABA-behandelten Keimlinge, zeigt sich ein deutlicher Unterschied. Die Werte der behandelten Keimlinge erreichen je nach Versuchsansatz nur 25 bis 10% der Kontrollen. Absorptionsspektren ließen keine durch GABA verursachte Verschiebung der Maxima weder in der Pr- noch in der Pfr-Form gegenüber der Kontrolle erkennen. Vorhandenes Chromoprotein war voll photoreversibel und nicht in der Pr- oder Pfr-Form blockiert, was durch bloße Differenzspektroskopie nicht zu erkennen wäre. Der Unterschied ist demnach auf einer geringeren Chromophorabsorption und damit auf einen kleineren Chromoproteingehalt, bezogen auf das Frischgewicht, zurückzuführen. Dieses Resultat steht in Einklang mit den Ergebnissen, die Gardner und Gorton (1985) sowie Jones et al. (1986) bei ähnlichen Versuchen mit Erbsen erhalten haben, und auch Elich und Lagarias (1987) für Hafer angaben. Allerdings wandten sie eine andere Applikationstechnik an; sie ließen die Keimlinge direkt in 0.6 - 3 mM GABA-Lösungen quellen und wachsen. Bei Hafer erzielten Gardner und Gorton mit 4-Tage-alten Keimlingen mit 1 mM Inkubationslösung jedoch nur 55% Hemmung gegenüber der Kontrolle.

Das verringerte Frischgewicht deutet darauf hin, daß der Transaminaseinhibitor allgemein hemmend auf das Wachstum und die Entwicklung der behandelten Pflanzen wirkt, eine generelle Phytotoxizität also zu bestehen scheint.

So waren der Sproß, wie auch die Wurzeln kürzer gegenüber der Vergleichsgruppe, Carotinoidspektren zeigten keine Unterschiede.

Leider machten Gardner und Gorton (1985) bei Hafer diesbezüglich keine Angaben, bei 7 Tage-alten etioliierten Erbsen ermittelten sie für GABA-inkubierten Pflanzen ein um 41% höheres Frischgewicht der geernteten Epikotylhaken gegenüber der Kontrolle, berichten aber dennoch von einer "broad spectrum herbicidal activity" von GABA.

Elich und Lagarias (1987) beschrieben ebenfalls ein geringeres Wurzelwachstum und auch eine geringere Keimungsrate bei GABA-inkubierten Haferkeimlingen. Im Gegensatz zur differenzspektroskopischen Bestimmung wird bei der Immunoblot-Analyse auch nicht photoreversibles oder chromophorloses Phytochromprotein erfaßt. Während bei den Kontrollen kaum eine Diskrepanz zwischen beiden Resultaten zu beobachten ist, liegt der immunologisch meßbare Anteil an Pr bei den GABA-behandelten Keimlingen 4.5 bis 9 mal höher als der über $\Delta\Delta A$ -Messungen ermittelte. Der Großteil liegt demnach als Apoprotein vor, und der Gesamtphytochromgehalt, Apo + Chromoprotein, bezogen auf das Frischgewicht bei den GABA-inkubierten Haferschößlingen, gleicht den entsprechenden Werten der Kontrolle. Dieses Verhältnis fanden Alan Jones et al. (1986) auch bei Erbsen vor, Elich und Lagarias (1987) dagegen ermittelten bei ihren Versuchen mit Hafer einen Gesamtgehalt von 50-60% gegenüber der Kontrolle. Demnach beeinflußt GABA entweder die Chromophorbiosynthese oder hemmt den Chromophoreinbau in das Apoprotein. Letzteres erscheint unwahrscheinlicher, da GABA ebenfalls die Chlorophyllbiosynthese stark hemmt (Flint, 1984; Gardner und Gorton, 1985), Chlorophyll in seinen Proteinkomplex aber nicht kovalent wie der Chromophor in Pr gebunden ist. Zudem berichtete Alan Jones, daß ALA die $\Delta\Delta A$ -Minderung bei GABA-beeinflußten Keimlingen teilweise aufheben kann, auch Elich und Lagarias (1987) konnten dies bestätigen. Das läßt den Schluß zu, daß auch bei Hafer Chromophor- und Apoprotein-biosynthese nicht miteinander gekoppelt sind.

Eine Kopplung wird für die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* postuliert (Hamilton, Hofbauer und Ruis, 1982). Dort wurde für 2 Hämoproteine, Katalase T und Katalase A eine positive Regulierung auf der Translationsebene durch freies Hemin nachgewiesen. Die Ergebnisse der Inkubationsversuche mit GABA deuten darauf hin, daß dieser Sachverhalt für das kerncodierte Apoprotein von Phytochrom nicht zutrifft.

1.2.1.1. Inkubation mit Biliverdinlösung und Lävulinsäure

Biliverdin, das im tierischen Organismus durch eine oxidative Ringöffnung aus Protohäm gebildet wird, ist wie Protohäm eine Vorstufe für den Chromophor von Phycobiliproteiden, so für Phycocyanobilin das strukturell dem Phytochromobilin sehr ähnlich ist (Beale und Cornejo, 1983; Brown et al., 1984).

Deshalb wurde versucht, die Hemmung der Chromophorbiosynthese von Phytochrom bei Hafer durch GABA mit gleichzeitigem Auftropfen von Biliverdinlösung auf den Embryo zu beeinflussen. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse aufgeführt. Biliverdinlösung allein zeigt keinen Effekt auf das Frischgewicht der Keimlinge, scheint dagegen einen negativen Einfluß auf den Phytochromgehalt zu haben. Biliverdin und GABA zusammen, zeigen gleiche Ergebnisse wie GABA-Inkubation allein. Demnach ist keine positive Wirkung auf den Chromoprotein-gehalt festzustellen. Dies kann jedoch allein durch eine schlechte oder fehlende Aufnahme in den Embryo und seine Zellen, erklärt werden. Elich und Lagarias (1987) konnten dagegen bei mit GABA inkubierten Haferschößlingen, die allerdings erst nach der Keimung in abgeschnittenem Zustand dann mit Biliverdin behandelt wurden, eine Zunahme an spektroskopisch erfaßbarem Phytochrom gegenüber der Kontrolle ermitteln.

Lävulinsäure dagegen scheint sehr gut in den Keimling einzudringen, in 10 mM Konzentration trat vollkommene Keimungshemmung auf, auch bei 5 mM, wie in der Tabelle beschrieben, ist eine Frischgewichtsminderung gegenüber der Kontrolle festzustellen, ohne daß aber der Phytochromgehalt signifikant beeinflußt wurde. Lävulinsäure, als Strukturanalog zu ALA, wirkt als kompetitiver Inhibitor der ALA-Dehydrase, also jenes Enzyms, das 2 ALA-Moleküle zu Porphobilinogen verbindet, und ist als Hemmstoff für die Chlorophyll- sowie Gallenfarbstoff-Synthese bekannt (Beale, 1978; Schuster et al., 1983). Gardner und Gorton (1985) berichten auch von Versuchen mit Lävulinsäure, erzielten aber keine klare Phytochrominhibition, sondern sprechen von extrem variablen Resultaten und ebenfalls sehr hoher Phytotoxizität bei Konzentrationen, die Hemmungen auslösten.

1.2.2. Proteolytischer Vergleich von Apoprotein und Chromoprotein

Um das Phytochrom-Apoprotein im Vergleich zum Chromoprotein noch näher zu charakterisieren, wurde ein proteolytischer Abbau mit *Staphylococcus* V-8 Protease durchgeführt. V-8 spaltet bevorzugt an Glu sowie Asp und wird von Cleveland (1983) wegen ihrer guten Eigenschaft, was Konstanz und Empfindlichkeit der erzeugten Peptidmuster betrifft, favorisiert. Allerdings wurde der Abbau ohne Zugabe von SDS durchgeführt, um nicht die unterschiedliche räumliche Struktur zu zerstören. Der zugesetzte Anteil an V-8 wurde dabei auf die gemessene Phytochromgesamtkonzentration bezogen und hoch dosiert, da in den Extrakten noch sehr viel Fremdprotein vorhanden war, und durch kurze Reaktionszeiten der Einfluß endogener Proteasen minimiert werden sollte.

Zum Abbau wurden Proben der GABA-Versuche sowie der unbehandelten Kontrollen zunächst HR oder DR bestrahlt und im Dunkeln mit Protease V-8 inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurde die Reaktion gestoppt und die entstandenen Peptidgemische über SDS-PAGE und Immunoblot-Analyse aufgetrennt und sichtbar gemacht.

Um unspezifische Reaktionen möglichst auszuschließen, wurden zur Detektion dieser Peptide 2 verschiedene monoklonale Antikörper, Z3B1 sowie CC5, angewendet. Beide zeichneten sich durch die Erkennung auch kleiner Bruchstücke von Phytochrom aus (Grimm et al., 1986, sowie persönliche Mitteilung).

Abbildung 3 zeigt den Blot eines Abbaubersuchs, bei dem pro Spur ursprünglich 1000 μ PE (jeweils Kontrolle sowie GABA-behandelt) aufgetragen wurden, die Konzentration der V-8-Protease betrug 2.5 μ g auf 10 mPE, das Verhältnis von Chromo- zu Gesamtphytochrom belief sich auf 1:8. Daraus folgt, daß 975 μ PE auf Apoprotein entfallen und 125 μ PE aus Chromoprotein bestehen. Für die Kontrolle war dieses Verhältnis 1:1, da hier kaum Differenzen zwischen immunologisch und spektral nachweisbaren Phytochromgehalt auftraten.

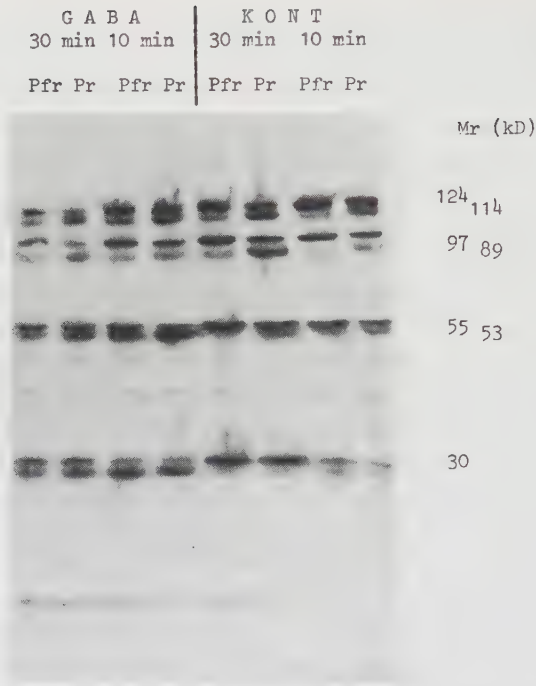


Abb. 3: V-8 Protease Abbau von Extrakten GABA-inkubierter Keimlinge (=GABA) sowie unbehandelter Kontrollen (=KONT). Phytyochrome-Holoprotein in den Proben wurde durch vorherige HR- oder DR-Bestrahlung in die Pr oder Pfr-Form überführt und dann 10 min und 30 min mit V-8 Protease (1 µg auf 2.5 mPE Gesamtphytyochrome) verdaut. Es wurden jeweils gleiche Volumina des Verdauungsgemisches aufgetragen, zum Zeitpunkt 0 entsprach dies einer Menge von 1.0 mPE Gesamtphytyochrome. SDS-PAGE wurde mit einem linearen Gradienten von 7.5 - 15 % durchgeführt. Rechts sind die Molekulargewichte der Hauptpeptide angegeben.

Vergleicht man gleiche Zeitwerte der jeweils HR oder DR belichteten GABA-Proben, läßt sich kein Unterschied feststellen. Neben der Bande des intakten 124 kD Proteins sind Hauptbanden der Abbaupolypeptide bei 114 kD, 97 kD, 89 kD, 55 und 53 kD sowie bei 30 kD zu sehen. Schwächere Banden sind noch bei 85 kD zu bemerken. Bei den Pr-, Pfr-Kontrollen ist dagegen ein Unterschied erkennbar. Bei den DR-bestrahlten Proben entspricht das Abbauemuster in etwa dem der GABA-Proben, außer der 53 kD Bande, die etwas schwächer

ausgeprägt zu sein scheint. Die HR-bestrahlten Parallelen unterscheiden sich dagegen stärker, ihnen mangelt es an deutlichen Banden im 114 kD-, sowie im 53 kD-Bereich.

Zusätzlich ist noch ein deutlicher Unterschied im 30 kD-Bereich zu erkennen. Bei den beiden Pr- sowie Pfr-Kontrollen dominiert die obere Bande, besonders beim 30 Minuten-Wert, während die beiden Banden im 30 kD-Bereich bei den GABA-Proben gleichstarke Ausprägung aufweisen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich das durch V-8-Abbau erzeugte Bandenmuster bei den GABA-Extrakten nicht durch vorherige HR- oder DR-Bestrahlung ändert und sich sowohl von Pfr-Kontrollen, wie auch von Pr, wenn auch schwächer, unterscheidet. Daraus läßt sich folgern, daß das Apoprotein eine andere räumliche Tertiärstruktur besitzt als das Chromoprotein in Pr- oder Pfr-Form. Demnach ist es denkbar, daß der Einbau des Chromophors das räumliche Gefüge des Apoproteins beeinflußt. Interessant wäre in dieser Hinsicht noch, ob auch bereits das Apoprotein als Dimer auftritt, was aber aus den Ergebnissen dieser Versuche nicht zu klären ist. Das gleiche Abbaumuster der GABA-Proben nach HR- oder DR-Bestrahlung bestätigt auch noch einmal, daß infolge der Behandlung weit mehr Apoprotein als Chromoprotein vorliegt, die Synthese von Apoprotein und Chromophor also nicht gekoppelt zu sein scheint. Zusätzlich kann man folgern, daß es sich in der Zelle im Dunkeln ähnlich stabil wie Pr erweist, dem es nach den Abbauprobe-suchen auch in der Tertiärstruktur ähnlicher ist als Pfr, das ja nach dem Entstehen in vivo schnell proteolytisch zersetzt wird. Inwieweit das Apoprotein nach HR-Belichtung in vivo stabil bleibt, oder ebenfalls wie Pfr "verschwindet", wäre interessant zu wissen. Jones et al.(1986) konnten bei ihren Untersuchungen nachweisen, daß durch GABA-Inkubation gebildetes Apoprotein nach HR-Bestrahlung ähnlich wie Pfr abgebaut wird. Demnach dürfte jener Mechanismus, der für die Zerstörung von Pfr verantwortlich zu machen ist, auch chromophorfrees Apoprotein erkennen und einbeziehen.

1.3. Abschließende Diskussion

Die Resultate der hier unternommenen Versuche sprechen für eine Beteiligung des C-5-Weges an der Biosynthese des Phytochrom-Chromophors. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß auch der Shemin-Weg dazu beiträgt. Für *Euglena gracilis*, einem Phytoflagellaten, fanden Beale und Foley (1982), daß beide Wege nebeneinander vorliegen, wobei ALA-Synthase (Shemin-Weg) anschließend für die Entstehung von nicht plastidären Porphyrinen verantwortlich sein soll, und auch nur dann, wenn die Zellen nicht durch ergrünende oder grüne Plastiden fähig waren, ALA über den C-5-Weg zu bilden. Allerdings nimmt *Euglena* eine phylogenetische Sonderstellung ein und ist tierischen Protisten näher zu stellen als Algen und grünen Pflanzen. Meller und Gassman (1982) schlagen ebenfalls eine Beteiligung von ALA-Synthase bei der Tetrapyrrolsynthese in etiolierten Gerstenblättern vor. Allgemein wird angenommen, daß der Shemin-Weg auch in Pflanzen, falls er vorhanden ist, wie bei tierischen Organismen in den Mitochondrien abläuft, und die daraus entstandenen Porphyrine nicht in die Plastiden exportiert werden. Dagegen fanden Chibbar und Huystee (1985) bei Erdnußzellkulturen, daß die prosthetische Gruppe der Peroxidase, einem unter diesen Kulturbedingungen ins Medium abgegebenen Hämoprotein, über den C-5-Weg in den Mitochondrien synthetisiert wird. Dem kann nun allerdings entgegengehalten werden, daß es sich dabei doch um ein sehr artifizielles System handelt, die Zellen werden durch ein spezielles "high sucrose medium" chlorophyllfrei gehalten. Auch für die einzellige Rotalge "*Cyanidium caldarium*" konnten Weinstein und Beale (1984) nachweisen, daß Protohäm und Häm a, die prosthetische Gruppe der mitochondrialen Cytochrom Oxidase, über den C-5-Weg aufgebaut werden. Dagegen fand Flint (1984), daß Blätter, bei denen die Chlorophyllsynthese nahezu 100% durch GABA gehemmt wurde, normale Atmungsraten aufwiesen und ebenfalls einen normalen Gehalt von Cytochrom Oxidase in isolierten Mitochondrien zeigten. Da GABA nicht die ALA-Synthetase von *R. spheroides* hemmt, schließt er, daß ALA-Synthetase in Chloroplasten nicht vorhanden ist, aber in pflanzlichen Mitochondrien vorkommt.

Bezieht man Flints Überlegungen auf die hier unternommenen GABA-Versuche, könnte das für Phytochrom bedeuten, daß der Chromophor

aus den Plastiden stammt und über den C-5-Weg synthetisiert wird. Das wäre auch mit Beobachtungen von Grombein et al. (1978) vereinbar, die nach Pr-Destruktion im Weißlicht bei der Untersuchung von subzellulären Fraktionen von Haferkeimlingen eine Resynthese von spektral reversiblen Phytochrom im Dunkeln besonders in der Plastiden- und weniger in der Mitochondrienfraktion und dem Totalhomogenat feststellten. Daran schließen sich nun die weiteren Fragen, wie und wo der Chromophor in das Protein eingebaut wird. Dadurch, daß Chromophor- und Proteinsynthese nicht gekoppelt sind, erscheint die Möglichkeit, daß der Chromophor direkt am Ribosom in die wachsende Proteinkette eingebaut wird, unrealistisch. Diese Beobachtung favorisiert eher die voneinander unabhängige Synthese der Partner. Der Zusammenbau erfolgt dann in einem getrennten Schritt, wobei es wahrscheinlicher ist, daß dies im Cytosol und nicht im Plastid (oder Mitochondrion ?) geschieht. Dafür spricht, daß der Chromophor oder Vorstufen des Chromophors leichter durch die Membrangrenzen zu transportieren sind, als das doch große kerncodierte Apoprotein, das danach zudem als Chromoprotein noch einmal die Membran passieren müßte. Zudem handelt es sich beim Apophytochrom um ein gut lösliches, globuläres Protein (Vierstra und Quail, 1986) und nicht um ein Membranprotein. Es ist am Apoprotein auch keine Signalsequenz vorhanden, die nach dem Transport in den Plastiden dann abgespalten werden könnte, wie es für einige kerncodierte Chloroplasten- und Mitochondrienproteine, z.B. der kleinen Untereinheit der Ribulosebisphosphat-Carboxylase, nachgewiesen wurde.

Auch konnte mit immunocytochemischen Methoden (Goldlabeling) und Elektronenmikroskopie Phytochrom weder in Plastiden noch in Mitochondrien (auch nicht im Nucleus) gefunden werden (Speth et al., 1986, 1987). Andererseits konnte die endgültige Synthese von Phytochrom im Cytosol bisher auch nicht eindeutig nachgewiesen werden; der Ort der Chromophorkopplung könnte auch an der Außenmembran der Pro-Plastiden liegen. Klarheit über diese Frage könnten vielleicht in vitro Versuche mit reinem Apoprotein schaffen, das über reine Phytochrom mRNA, die über Pr-cDNA zu gewinnen wäre, im zellfreien Translationssystem herstellbar und dann auch mit radioaktiven Aminosäuren zu markieren ist.

2. Untersuchungen zur Heterogenität von Phytochrom

2.1. Isoelektrische Fokussierung von nativem Pr, Pfr

Lange bevor durch die Untersuchungen von Hershey et al. (1985) offensichtlich wurde, daß in etiolierten Avena-Keimlingen mindestens vier verschiedene Phytochromgene exprimiert werden, gab es bereits Berichte, daß Pr durch IEF in Isoformen mit voneinander abweichenden isoelektrischen Punkten (IEP's) aufzutrennen ist. Balangé und Rollin (1973) beschrieben ein Aufreinigungsverfahren für Haferphytochrom, bei dem auch isoelektrische Fokussierung in einem Sucrose- sowie Glyzerin-Gradienten angewendet wurde und fanden Phytochrom-Isoformen mit pI's zwischen pH 6,4 und 4,0; das Maximum lag bei pH 6,25 - 6,45. Hunt und Pratt (1979) führten IEF in Acrylamidgelen mit aufgereinigtem Phytochrom durch und fanden Isoformen im pH-Bereich von 5,8 - 6,4. Bei weitergehenden Versuchen (Hunt und Pratt, 1981) wurden diese Ergebnisse bestätigt, zudem konnte nach IEF in Acrylamidgelen zwischen Pr und Pfr kein Unterschied im Bandenmuster festgestellt werden.

Allerdings wurden alle diese Untersuchungen mit 118, 114 kD Phytochrom und nicht mit dem Vollängenprotein durchgeführt. Vierstra und Quail (1982b) führten als Erste eine IEF mit 124 kD Phytochrom durch und bestimmten einen pI von 5,9 für das Chromoprotein. Allerdings dürfte das Protein bei der Fokussierung nicht mehr in seinem nativen Status vorgelegen haben, denn sie wandten folgende Methoden an: Phytochrom wurde als Pfr aus dem Rohextrakt immunpräzipitiert und 5 Minuten in Elektrophoreseprobenpuffer gekocht, mit kaltem Aceton daraus gefällt, in 9,5 M Harnstoffpuffer aufgenommen und auf das Acrylamid-Zylindergel aufgetragen. Ob sich das Phytochromprotein nach diesen für Tertiär- und Quartärstruktur doch harten Maßnahmen während des IEF-Laufs wieder vollständig renaturiert, darf stark bezweifelt werden und erscheint sehr unwahrscheinlich.

2.1.1. pI von Phytochrom

Unter diesen Gesichtspunkten erschien es sinnvoll, eine IEF von aufgereinigtem, 124 kD Phytochrom durchzuführen, und den pI von nativem Phytochrom in der Pr- sowie Pfr-Form mit dem von denaturiertem Phytochrom zu vergleichen. Abbildung 4 zeigt eine Fokussierung von nativem Phytochrom in einem Agarose-Flachgel.

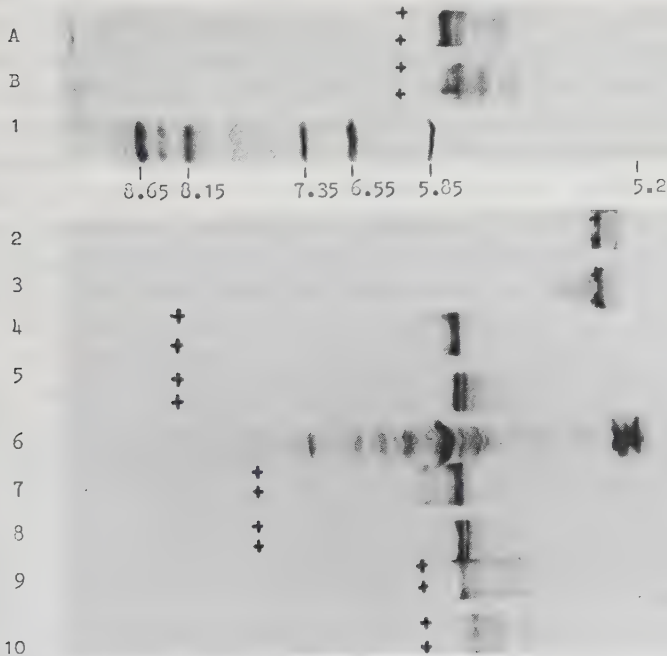


Abb. 4:

Agarose Flachgel-Isoelektrische Fokussierung von aufgereinigtem Phytochrom in der Pr- oder Pfr-Form; aufgetragen wurden je nach Spur 12 µl einer Phytochromlösung in 10 mM KPP, pH 7.8 mit $E_{666} = 0.5$ und einem Reinheitsindex von 0.90, entsprechend 6 µg Protein. Die Kreuze markieren den Auftragsort der Proben, die Pfeile geben den IEP der Markerproteine und damit den pH-Gradienten im Gel an. Als Trägerampholyt wurde Servalyt 3-10 in einer Endkonzentration von 2.5% verwendet. Nach $\frac{1}{2}$ h bei 300 Volt max. zum Entsalzen wurde bei 10 W Leistung mit $U_{max.} = 2$ kV fokussiert und bei 7000 V·h abgebrochen. Die Gesamttrennstrecke betrug 10 cm.

Spur 1 = pI-Marker (Pharmacia); 2 = Pr; 3 = Pfr; 4 = Pr; 5 = Pfr; 6 = pI-Marker (Serva); 7 = Pr; 8 = Pfr; 9 = Pr; 10 = Pfr; A = Pr; B = Pfr; A,B: 12 µl einer Phytochrom-Lösung, $E_{666} = 0.8$, SAR = 0.83, in 10 mM KPP, pH 7.8;

Zunächst sei angemerkt, daß bei der Fokussierung von aufgereinigten Phytochromproben bei weiten pH-Gradienten relativ hohe V·h-Produkte und damit auch $V \cdot h / l^2$ Quotienten (dabei bedeutet l die Trennstrecke des Fokussierungsgels in cm; Dunn und Burghes, 1983) nötig waren, bis das Equilibrium an seinem IEP erreicht war.

Bei kürzeren V·h-Produkten schmierten die Phytochrombanden zum Auftragspunkt auf die Kathodenseite hin und zeigten keine klare Auftrennung.

Spur 1 und 6 zeigen das Bandenmuster von pI-Markern; ihr Auftragspunkt ist nicht markiert, lag aber auf gleicher Höhe wie Spur 9 und 10. Bei Bahn 2 und 3 wurde Pr, Pfr nahe der Anode aufgetragen, der größere Teil des Proteins bildete 2 Banden im sauren Bereich bei $pH = 5.3$, es traten jedoch auch Präzipitation und Schmierfahnen zu höheren pH-Werten auf. Bei Spur 4 und 5 lagen die Auftragspunkte nahe der Kathode, es ist keine Ausfällungslinie dort zu sehen, Phytochrom fokussiert in 2 Haupt- und einigen Nebenbanden. Dabei ist ein Unterschied zwischen Pr und Pfr zu beobachten. Die Hauptbanden bei Pr liegen im pH-Bereich 5.85 - 5.8, bei Pfr dagegen zwischen 5.8 - 5.75. Zudem fehlen Pfr die basischen Banden des Pr, bei dem dagegen die Banden im sauren zumindest schwächer ausgeprägt oder nicht vorhanden sind. Andererseits scheint die Hauptbande bei $pH = 5.8$ bei beiden Phytochromformen übereinzustimmen. Spur 7 und 8 zeigen eine ähnliche Verteilung wie 4 und 5, verglichen dazu war jedoch der Auftragspunkt mehr zur Gelmitte gerückt worden. Bei 9 und 10 lag er bereits in der Anoden-Hälfte, und hier zeigt sich ein vollkommen unterschiedliches Bandenmuster gegenüber den vorherigen Spuren. Die Verteilung erscheint viel diffuser, die noch schwach sichtbaren Banden sind auseinandergerückt und in den sauren Bereich verschoben. Wie auch Spur 2 und 3 schon erkennen lassen, ist diese Verschiebung um so stärker, je weiter der Auftragspunkt in der Anoden-Hälfte des Gels liegt, je näher er also dem IEP von Phytochrom kommt. Diese Beobachtung konnte auch bei anderen Gelen mit engeren pH-Gradienten (Servalyt 5 - 7 80%, 3 - 10 20%) gemacht werden, ohne daß jedoch die Auflösung der einzelnen Banden verbessert werden konnte. Der kritische Bereich für diesen Effekt dürfte bei $pH 7.2$ liegen, lag der Auftragspunkt saurer als dieser pH-Wert, trat diese Verschiebung auf. Bei den Spuren A,B ist noch

einmal deutlicher zu sehen, daß trotz dieser Änderung im Fokussierverhalten von Phytochrom der Unterschied zwischen Pr, Pfr weiterhin bestehen bleibt.

Abbildung 5a zeigt eine AIEF mit einem flacheren Ampholytgradienten, Servalyt 6 - 7 70%, 3 - 10 30%. Trotz des leicht verzerrten Gradienten ist auch hier ein deutlicher Unterschied zwischen Pr und Pfr im Fokussierverhalten zu erkennen. Die beiden Hauptbanden erscheinen stärker gespreizt voneinander und diffuser verteilt, die Gesamtorientierung gleicht dennoch dem Bild, das bei dem Gradienten 3 - 10 erhalten wurde: Pfr fokussiert weiter im sauren Bereich als Pr, weist also einen niedrigeren pI auf. Abbildung 5b zeigt eine AIEF mit einem Trägerampholyt der Firma Pharmacia, Pharmalyt 5 - 8. Auch hier ist der Unterschied Pr-Pfr deutlich erkennbar, andererseits ist das Fokussiermuster von Phytochrom diffuser als bei den Gelen mit Servalyt, obwohl die Markerproteine ebenfalls scharfe Banden aufweisen.

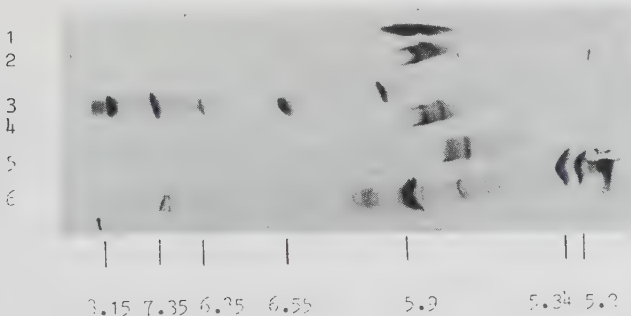


Abb. 5a:

AIEF von aufgereinigtem Phytochrom. Aufgetragen wurden je Spur 12 µl einer Phytochromlösung in 10 mM HEPES pH 7.8 mit $E_{666} = 0.32$ und einem Reinheitsindex (SAR) von 0.99, entsprechend 3.8 µg Protein. Als Trägerampholyt diente eine Mischung von Servalt 6-7 70%, 3-10 30% in einer Endkonzentration von 2.5%. Die Fokussierdauer betrug 4650 V·h, die Trennstrecke 10.5 cm. Die Pfeile markieren die Lage der Markerproteine und ihren IEP.

Spur 1 = Pfr (durch Randeffect verkrümmte Banden);
 Spur 2 = Pr; Spur 3 = pI-Marker (Pharmacia); Spur 4 = Pr;
 Spur 5 = Pfr; Spur 6 = pI-Marker (Serva);

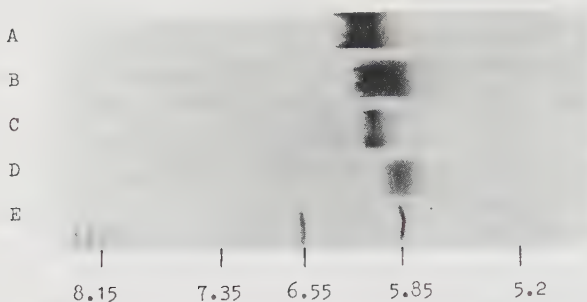


Abb. 5b:

AIEF von aufgereinigtem Phytochrom. Als Trägerampholyt diente hier Pharmalyt 5-8 in einer Endkonzentration von 2.5%. Die Fokussierdauer betrug 4200 V·h, die Trennstrecke 10 cm.

A = Pr (12µl, $E_{666} = 0.85$, SAR = 0.87);

B = Pfr (12µl, $E_{666} = 0.85$, SAR = 0.87);

C = Pr (12µl, $E_{666} = 0.5$, SAR = 0.9);

D = Pfr (12µl, $E_{666} = 0.5$, SAR = 0.9);

E = pI-Marker (Pharmacia);

2.1.2. Native Gelelektrophorese

Als einfachste Erklärung für die aufgetretenen mehreren Banden bei der Fokussierung bietet sich an, daß Phytochrom nicht nur als Dimer (Jones und Quail, 1986), sondern auch als Mono- oder Oligomer auftritt. Durch die derart vorhandenen Kontaktstellen zwischen den Proteinen könnten geladene Gruppen entweder maskiert oder aber an die Oberfläche gelangen, was unterschiedliche isoelektrische Punkte bedingen könnte. Um nun diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde eine native Gelelektrophorese unternommen. Abbildung 6 zeigt das Ergebnis einer derartigen Auftrennung.

Front -->

1 2

3 4

5 6

Abb. 6:

Diskontinuierliche , native PAGE von HR oder DR belichteten Phytochromproben, Sammelgel: 2.5% Acrylamid pH 7.8, Trenngel: linearer Gradient 4 - 8% Acrylamid pH 8.8; Aufgetragen wurden je 10 µl dreier unterschiedlicher Phytochromproben;

Spur 1,2,: Phytochrom: $E_{Pr666} = 0.8$; SAR = 0.94

Spur 3,4,: Phytochrom: $E_{Pr666} = 0.7$; SAR = 0.85

Spur 5,6,: Phytochrom: $E_{Pr666} = 0.3$; SAR = 0.99

1)Pr 2) Pfr 3) Pr 4) Pfr 5) Pr 6) Pfr

Deutliche Hinweise auf unterschiedliche Aggregationen der Phytochromproteine sind auf dem Gel nicht erkennbar. Die Hauptbanden erscheinen trotz Gradientengel relativ diffus und lassen keine prägnante Unterteilung, die auf verschiedene Oligomere schließen lassen könnte, erkennen. Dagegen ist ein Unterschied im Laufverhalten der beiden Phytochromformen Pr und Pfr erkennbar, der sich gleichermaßen in allen Proben manifestiert. Pfr läuft dem Pr voraus und besitzt demnach in diesem Auftrennungssystem die höhere Mobilität.

2.1.3. Diskussion

Über einen unterschiedlichen pI von Pr und Pfr liegen in der Literatur bisher keine Angaben vor. Vierstra und Quail (1982b) fokussierten denaturiertes Phytochrom, das 5 Minuten in SDS-haltigen Probenpuffer gekocht worden war. Sie fanden dann aber in der 2. Dimension nach Analyse dieser PAGIEF über SDS-PAGE nur eine 124 kD Bande, obwohl Jones und Quail (1986) hervorheben, daß durch Kochen von Phytochrom in SDS-haltigen Puffern Aspartyl-Prolyl-Peptidbindungen getrennt werden und somit Spaltpeptide mit geringerem Molekulargewicht entstehen, was durch eigene Versuche bestätigt werden konnte (siehe 2.2.5.). Hunt und Pratt (1981) konnten, wie bereits unter 2.1 erwähnt, bei der Fokussierung zwischen Pr und Pfr keinen Unterschied im Bandenmuster feststellen. Sie benutzten für ihre Versuche jedoch bereits proteolytisch degradiertes Phytochrom von 118/114 kD, das zudem bei der Aufreinigung mit 3 M $MgCl_2$ Lösung eluiert wurde, was nach Vierstra und Quail (1982a) zu einer spektralen Denaturierung des Chromoproteins führt. Dies mögen Gründe dafür sein, daß bei ihnen keine differenten pI-Werte für Pr und Pfr auftraten. Über die Mobilität beider Phytochromformen in Systemen mit konstantem pH-Wert, wie der durchgeführten nativen Gelelektrophorese, gibt es allerdings Untersuchungen, die ebenfalls Unterschiede zwischen Pr und Pfr zeigen. Lagarias und Mercurio (1985) führten eine sterische Ausschluß-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (SEC-HPLC) durch, fanden für Pr eine höhere Retentionszeit gegenüber Pfr und führten dies auf Volumendifferenzen zurück. Jones und Quail (1986) konnten diese Ergebnisse bei der Verwendung von Tris-Puffern pH 7.2 - 9.2 bestätigen, fanden aber mit NaPP-Puffern pH 7.2, sowie mit Tris pH 6.2 keinen Unterschied. Sollte diese Volumendifferenz bei der Auftrennung in der nativen Gelelektrophorese zum Tragen kommen, wäre zu erwarten, daß Pr vor Pfr läuft, das durch die Poren im Acrylamidgel auf Grund seiner größeren Ausdehnung stärker zurückgehalten wird. Deshalb dürfte eher eine erhöhte negative Ladung von Pfr gegenüber Pr unter den gewählten Laufbedingungen als Ursache für die beobachteten Unterschiede in Frage kommen, was ebenfalls mit dem niedrigeren pI in Einklang zu bringen wäre. Als weitere Möglichkeit könnte man noch an stärkere Interaktionen von

Pr gegenüber Pfr mit der hydrophilen Gelmatrix denken. Dies sollte aber bei der IEF in Agarose mit den angewandten hohen Spannungen und Feldstärken zu vernachlässigen sein, hier dürften allein die Zahl und Verteilung der Ladungen an der Oberfläche des Proteins maßgebend sein. Interessant ist in dieser Hinsicht, daß angenommen wird, daß der Pr-Chromophor im nativen Protein protoniert vorliegt, die Propionsäure-Seitenketten also keine negative Ladung tragen (Lagarias und Rapoport, 1980, Rüdiger, 1986), während für den Pfr-Chromophor auch eine Anionenbildung diskutiert wird. Erwiesen ist, daß der Chromophor in der Pfr-Form freier zugänglich ist als in der Pr-Form (Song, 1985), weshalb auch eine Dissoziation der freien Carboxylgruppen der Propionsäure-Seitenketten vorliegen könnte. Das Ergebnis der Fokussierung, wie auch der nativen Gelelektrophorese wäre mit dieser Interpretation in Einklang zu bringen. Bei Proteindimeren wäre auf diese Weise zwischen Pr- und Pfr-Form mindestens ein zweifacher Ladungsunterschied zu erwarten. Diese Differenz könnte die von einander abweichenden IEP's und Retentionszeiten von Pr und Pfr in den Auftrennungssystemen erklären. Wahrscheinlicher ist jedoch, für diese Unterschiede eine andere Verteilung der direkt an der Proteinoberfläche befindlichen, geladenen Aminosäure-Seitenketten als Ursache anzunehmen.

Nach der nativen Gelelektrophorese sind keine deutlichen Anzeichen dafür zu finden, daß Phytochrom unter jenen Bedingungen außer als Dimer auch in anderen Aggregaten auftritt. Auch die Untersuchungen von Lagarias und Mercurio sowie von Jones und Quail ließen keine derartigen Tendenzen erkennen. Erst bei 1 M NaCl-Konzentration in Elutionspuffer konnten Jones und Quail (1986) eine teilweise Dissoziation in Monomere beobachten. Allerdings ist nicht vollkommen auszuschließen, daß eine Dissoziation unter den IEF-Bedingungen (hohe Feldstärke, pH am pI des Proteins) auch ohne hohe Salzkonzentration eintreten könnte.

Eine derartige Dissoziation, ebenso aber auch eine Aggregation könnte für die beobachtete Verschiebung der Banden von Phytochrom verantwortlich sein, wenn man die Proben bei der AIEF zu sehr im sauren Bereich aufträgt (siehe 2.1.1).

Als grundsätzliche Ursache für dieses Verhalten ist eine Änderung in der Oberflächenladung des Chromoproteins in Betracht zu ziehen,

entweder werden basische, positiv geladene Gruppen maskiert oder saure, negativ geladene freigesetzt. Auch eine Kombination beider Möglichkeiten ist denkbar. Dabei ist nicht von einer vollständigen Denaturierung des Proteins auszugehen, da weiterhin Unterschiede zwischen Pr und Pfr im Bandenmuster bestehen bleiben. Ob diesen Phänomenen eine biologische Bedeutung zu Grunde liegt, oder es sich aber um ein Systemartefakt *in vitro* handelt, konnte hier nicht entschieden werden.

2.2. Fokussierung in denaturierenden Gelen

IEF unter denaturierenden Bedingungen wird allgemein in der Gegenwart von Harnstoff im Gel durchgeführt, der als chaotropes Reagens Wasserstoffbrückenverbindungen sowie hydrophobe Interaktionen zwischen sowie innerhalb von Polypeptidketten unterbindet. Dadurch können Aggregate und Komplexe aus mehreren Untereinheiten dissoziiert und Proteine so weit wie möglich entfaltet werden. Auch sollten nicht-kovalent gebundene Cofaktoren freigesetzt und der Einfluß der Konformation eines Proteins auf seinen pI vermindert werden (Zechel, 1977). Es wäre also zu erwarten, daß in IEF-Gelen mit 8 M Harnstoff kein Unterschied zwischen Pr und Pfr auftritt. Die Auflösung von Polypeptiden mit geringeren Ladungsdifferenzen wird durch die Entfaltung verbessert, Mikroheterogenität von Proteinen auf Grund verschiedener, möglicher Konformationen oder Aggregationen sollte verhindert werden. Auf diese Weise ist es möglich, Polypeptide mit nur einem Ladungsaustausch voneinander zu trennen (Anderson und Hickman, 1979). Allerdings hängt dies vom pI sowie vom Molekulargewicht und der Aminosäurezusammensetzung ab (O'Farrel, 1975) und ist sicher nicht für jedes Protein zu erreichen.

Abbildung 7 zeigt ein Agarose IEF-Gel mit 8 M Harnstoff und weitem pH-Gradienten mit Servalyt 3-10.



Abb.7: UAIEF von aufgereinigtem Phytochrom in 8 M Harnstoff, Servalyt 3-10 in einer Endkonzentration von 2.5%, 1.3 mM DTT; Aufgetragen wurde je Spur 12 μ l Phytochromlösung zweier verschiedener Aufarbeitungen $E_{866} = 0.8$ bzw. 0.75, SAR = 0.83 bzw. 0.85 in der Pr- oder Pfr-Form in 10 mM KPP in 10 mM KPP pH 7.8 oder aber in 8M Harnstoff, 1.3 mM DTT, wobei die Proben nach der Resuspendierung Weißlicht bestrahlt worden waren. Der Fokussierungslauf erfolgte im Dunkeln, die Trennstrecke betrug 9.5 cm. Nach $\frac{1}{2}$ h Entsalzen bei 300 Volt max. wurde bei 10 Watt Leistung mit $U_{max.} = 2.5$ kV fokussiert und bei 4200 V·h abgebrochen. Der Auftragsort für alle Proben lag 2.4 cm vom Kathodenstreifen entfernt.

1 = Pr;	2 = Pr;
3 = Pfr;	4 = Pfr;
5 = Phytochrom in Harnstoff;	6 = pI-Marker (Serva);
7 = pI-Marker (Pharmacia);	8 = Phytochrom in Harnstoff;
9 = Phytochrom in Harnstoff;	10 = Phytochrom in Harnstoff +
	0.5% SDS;

Die Pfeile geben die Lage der pI-Markerproteine und deren pI unter nicht denaturierenden Bedingungen an.

Dabei sei angemerkt, daß auch die pI's von Markerproteinen durch Denaturierung beeinflusst werden. Dennoch scheint ihre Orientierung nahezu unverändert zu bleiben, nur das Protein mit pI 5.85 (bovine

carbonic anhydrase), bei den Pharmacia-Markern wechselte den Platz. Im Vergleich zu Conalbumin, pI 5.9, Serva-Marker, das weiterhin ähnlich wie Phytochrom fokussierte, verschwand es aus diesem Bereich, könnte aber mit einer Bande identisch sein, die nun zwischen dem pI-Markern 6.55 und 7.35 von Pharmacia neu auftrat. Von einer Verschiebung der beiden Anhydrase-Markern bei Harnstoff-AIEF-Gelen in den basischen Bereich berichtete auch Stromska (1982). Phytochrom selbst zeigte, wie im nativen Gel, weiterhin Heterogenität; es konnten deutlich 2 schwache, sowie 2 starke Banden bei Pfr und den in Harnstoff aufgenommenen Proben unterschieden werden. Pr zeigte ähnliche Hauptbanden, die basischen Nebenbanden erschienen jedoch schwächer ausgeprägt, dafür traten mehrere saurere Banden hinzu. Es ist also wieder ein Unterschied zwischen Pr und Pfr zu sehen, allerdings dieses Mal mit umgekehrten Vorzeichen gegenüber den Verhältnissen bei nativen Fokussierungen. Mit 8 M Harnstoff im Gel zeigt Pr eine stärkere Orientierung der Banden im sauren als Pfr.

Dagegen weisen jene Proben, die zunächst gefällt, dann in 8 M Harnstoff resuspendiert und anschließend mit Weißlicht bestrahlt worden waren, ein Muster auf, das dem von Pfr gleicht. Zusätzlich mit 0.5% SDS versetzte Proben zeigen, verglichen mit dem nativem Gel, eine atypische Verteilung. Die Masse des Phytochroms verbleibt als verzerrte Bande im basischen Bereich bei pH 8 nahe dem Auftragspunkt, nur ein geringerer Anteil fokussiert in mehreren schwachen Banden im sauren, ohne jedoch ein vergleichbares Muster wie die anderen Proben aufzuweisen. SDS dürfte demnach in diesem Auftrennungssystem eher störend wirken, und wird sowieso wegen seiner starken, negativen Ladung schnell entfernt, was dann zu einem Ausfällen des somit gelösten Proteins führen kann.

Abbildung 8a zeigt ein Agarose IEF-Gel mit 8 M Harnstoff und einem engeren aufgespreizten pH-Gradienten mit 80% Servalyt 5-7 und 20% Servalyt 3-10.

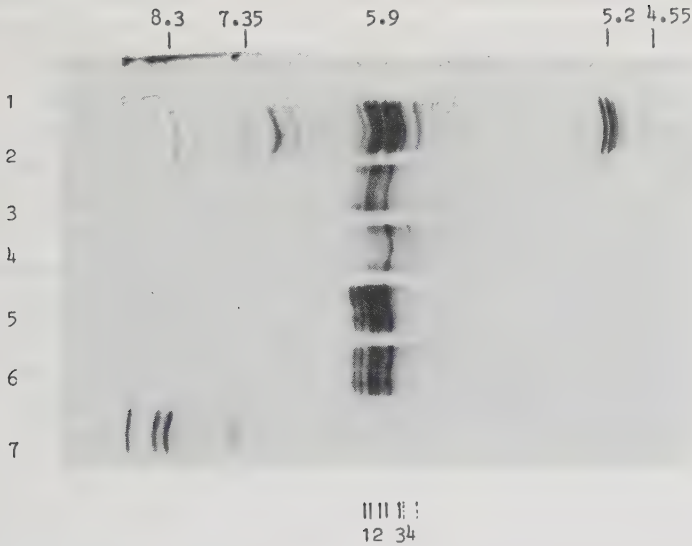


Abb. 8a:

UAIEF von aufgereinigtem Phytochrom in 8M Harnstoff, Servalyt 5-7 80%, 3-10 20% in einer Endkonzentration von 2.5%, 1.3 mM DTT; Aufgetragen wurde Phytochrom mit $E_{666} = 0.75$, SAR = 0.85. Die Trennstrecke betrug 9.5 cm, nach $\frac{1}{2}$ h Entsalzen bei 300 Volt max. wurde bei 14 Watt Leistung mit $U_{max.} = 2.5$ kV fokussiert und bei 4500 V·h abgebrochen. Der Auftragsort für alle Proben lag 2.5 cm vom Kathodenstreifen entfernt.

- 1 = pI-Marker (Pharmacia); 2 = pI-Marker (Serva);
- 3 = Pfr-Lösung in 10 mM kPP pH 7.8, 12 μ l;
- 4 = Pr-Lösung in 10 mM kPP pH 7.8, 12 μ l;
- 5 = Pfr-Lösung in 8 M Harnstoff, 4*konzentriert, 8 μ l;
- 6 = Pfr-Lösung in 8 M Harnstoff, 4*konzentriert, 8 μ l; nach dem Aufnehmen in die Harnstofflösung wurde noch einmal mit HR belichtet;
- 7 = pI-Marker (Pharmacia)

Die Pfeile geben die Lage der pI-Markerproteine und deren pI unter nicht denaturierenden Bedingungen an, die Ziffern 1, 2, 3 und 4 bezeichnen das charakteristische Bandenmuster.

Diese Mischung wurde meistens benutzt und trennte denaturiertes Phytochrom in ein typisches Bandenmuster auf, das wie folgt bezeichnet wird. Das am nächsten der Kathode liegende Bandenpaar wurde mit der Ziffer 1a,b charakterisiert, das mittlere Paar mit 2a,b die folgenden Bande mit ihrem schwachen Begleiter als 3a,b

und die Bande, die der Anode zugewandt ist, wurde mit 4 bezeichnet. Diese Benennung bezieht sich auf das Muster vollständig denaturierter Proben, wie im folgenden noch näher erklärt werden soll. Vergleicht man die Auftrennung des Gels in Abbildung 7 mit Servalyt 3-10 sowie jenes in Abbildung 8 mit 5-7 80%, 3-10 20%, wird deutlich, daß durch den engeren, gespreizten pH-Gradienten auch eine höhere Auflösung erreicht wurde. Die Banden 2 und 3 konnten mit dem breiten Gradienten nicht deutlich getrennt werden, was auch am Fokussierungsmuster des pI-Marker Proteins Conalbumin (Serva, pI = 5.9) sichtbar wird. Auch es erscheint gestauchter im Vergleich mit dem des engeren Gradienten. Dies läßt sich auch am Abstand der eindeutig zu identifizierenden pI-Marker 5.2 und 7.35 (Pharmacia) sehen. Er beträgt bei gleicher Trennstrecke beim Gradienten 3-10 4 cm, bei 5-7 6.3 cm und hat sich somit um 57% vergrößert.

Der Unterschied von Pr zu Pfr wird dadurch ebenfalls besser aufgelöst, die Grundtendenz bleibt gleich, die Verschiebung des Fokussierungsmusters ist jedoch deutlich zu erkennen. Bei Pr sind die Banden 1a,b und 2a,b weit schwächer ausgeprägt als bei Pfr, 3a ist ungefähr gleich, aber ihre schwache Nebenbande 3b dagegen etwas stärker sichtbar. Nummer 4 zeigt eine höhere Dichte gegenüber ihrem Pendant bei Pfr. Zusätzlich sind noch weitere schwache Nebenbanden im sauren zu sehen. Dabei liegen, wie man an dem Auftrennungsmuster von Conalbumin (Serva, pI = 5.9) beobachten kann, noch mehrere Ampholytkomponenten zwischen den Hauptbanden von Phytochrom. Demnach könnte zwischen ihnen ein größerer Ladungsunterschied bestehen. Bei Spur 5 und 6 wurde Phytochrom als Pfr zunächst gefällt und dann in 8 M Harnstoff aufgenommen. Die Konzentration betrug danach das 4-fache der Ausgangslösung. Bei Spur 6 wurde dann noch HR belichtet, was jedoch keinen Einfluß auf das Resultat zeigte. Auf Grund der höheren aufgetragenen Proteinmenge treten alle Banden stärker hervor, ansonsten gleicht das Fokussierungsmuster dem von Pfr in 10 mM KPP.

Abbildung 8b zeigt ein Agarose-IEF-Gel mit 8M Harnstoff und Pharmalyt 5-8 als Trägerampholyt. Phytochrom wies bei derartigen Gelen eine sehr diffuse Verteilung auf und fokussierte nicht in scharfen Banden. Zudem erfolgte die Entfärbung der Agaroseschicht

bei der Verwendung dieses Ampholyt-Fabrikats nur sehr langsam, weshalb im weiteren Servalyt zum Fokussieren bevorzugt wurde.

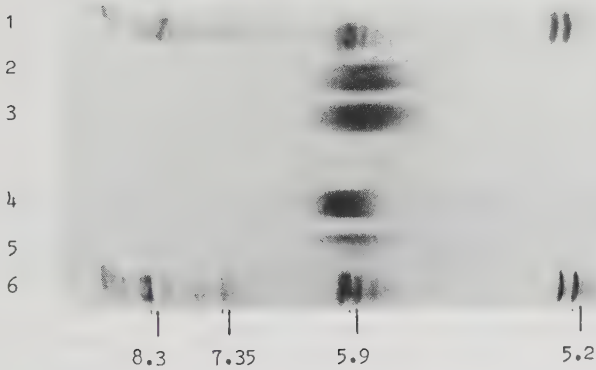


Abbildung 8b:

UAIEF von aufgereinigtem Phytochrom in 8M Harnstoff, Pharmalyt 5-8 in einer Endkonzentration von 2,5%, 1,3 mM DTT; Die Trennstrecke betrug 9.5 cm, die Fokussierdauer 4640 V.h.

1) und 6) = pI-Marker (Serva);

2) und 3) = Pfr in 8M Harnstoff, 2* aufkonzentriert, 10µl (SAR 0.9, $E_{666} = 0.9$);

4) = Pfr in 10 mM KPP, 10µl (SAR 0.89, $E_{666} = 0.85$);

5) = Pfr in 10 mM KPP, 5µl (SAR 0.89, $E_{666} = 0.85$) + 5 µl 8M Harnstofflösung;

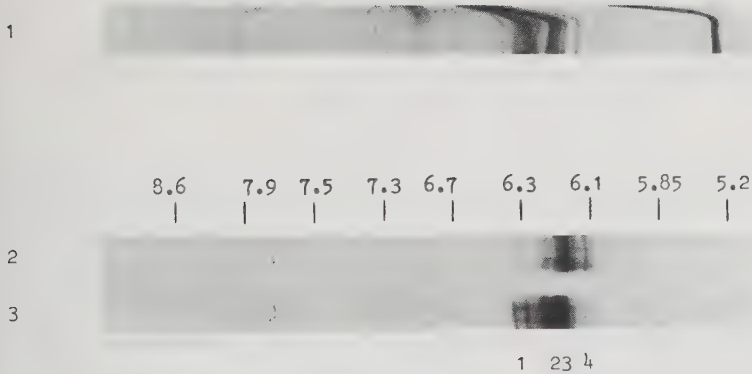
Die Pfeile geben die Lage der pI-Markerproteine und deren pI unter nicht denaturierenden Bedingungen an.

2.2.1. Unterschied Pr - Pfr

Wie sind nun die unterschiedlichen Bandenmuster von Pr und Pfr zu erklären ?

Fokussierungen im Weißlicht, sowie kurze WL- oder HR-Bestrahlungen der Auftragsproben während des IEF-Laufs ergaben ein Pfr-spezifisches Muster. Dies war durch anschließende DR-Belichtung nicht rückgängig zu machen. Wurde Pr dagegen in 8M Harnstoff gelöst und unter Sicherheitslicht fokussiert, resultierte das Pr-Muster. Diese Ergebnisse wiesen auf eine unterschiedliche Entfaltung der beiden Phytochromformen unter den gewählten, denaturierenden Bedingungen hin. Dies konnte auch spektroskopisch nachgewiesen werden. Abbildung 9 zeigt das Pherogramm einer UAIEF mit Servalyt 6-7 70% und 3 -10 30%.

Hier wurde Phytochrom als Pr oder Pfr gefällt, in Harnstoff aufgenommen und aufgetragen. Abweichend vom vorherigen Gel (Servalyt 5 - 7) stehen hier die weiter im sauren liegende Bande 2b der Doppelbande 2 sowie die Hauptbande 3a näher zusammen, was wohl auf den anderen Ampholyt zurückzuführen sein dürfte. Diese Lücke ist auch am pI-Marker zu sehen. Berücksichtigt man diesen Umstand, ergeben sich wieder die gleichen Verhältnisse wie sie bereits bei Abbildung 8 für den Unterschied Pr - Pfr beschrieben worden sind. Die Belichtung der Pr-Harnstofflösung mit HR verursachte auch hier das Auftreten des Pfr-Musters beim Fokussieren. Eine anschließende DR-Bestrahlung dieser Lösung zeigte keine Wirkung, es war keine Reversion zum Pr-Muster festzustellen.

**Abb. 9:**

UAIEF von Phytochrom in 8M Harnstoff, Servalyt 6-7 70%, 3-10 30% in einer Endkonzentration von 2.5%, 1.3 mM DTT; Aufgetragen wurde Phytochrom mit $E_{666} = 0.36$, SAR = 0.92, das in der Pr oder Pfr ausgefällt und 6*konzentriert in 8 M Harnstoff, 1.3 mM DTT aufgenommen worden war.

Die Trennstrecke betrug 10 cm, nach $\frac{1}{2}$ h Entsalzen bei 300 Volt max. wurde bei 15 Watt Leistung mit $U_{max.} = 2.5$ kV fokussiert und bei 4500 V·h abgebrochen. Der pH-Gradient wurde mit einer Oberflächen-elektrode gemessen und ist am Rand angegeben, die Ziffern 1, 2, 3 und 4 bezeichnen das charakteristische Bandenmuster.

1 = pI-Marker (Serva);

2 = Pr in Harnstoff;

3 = Pfr in Harnstoff;

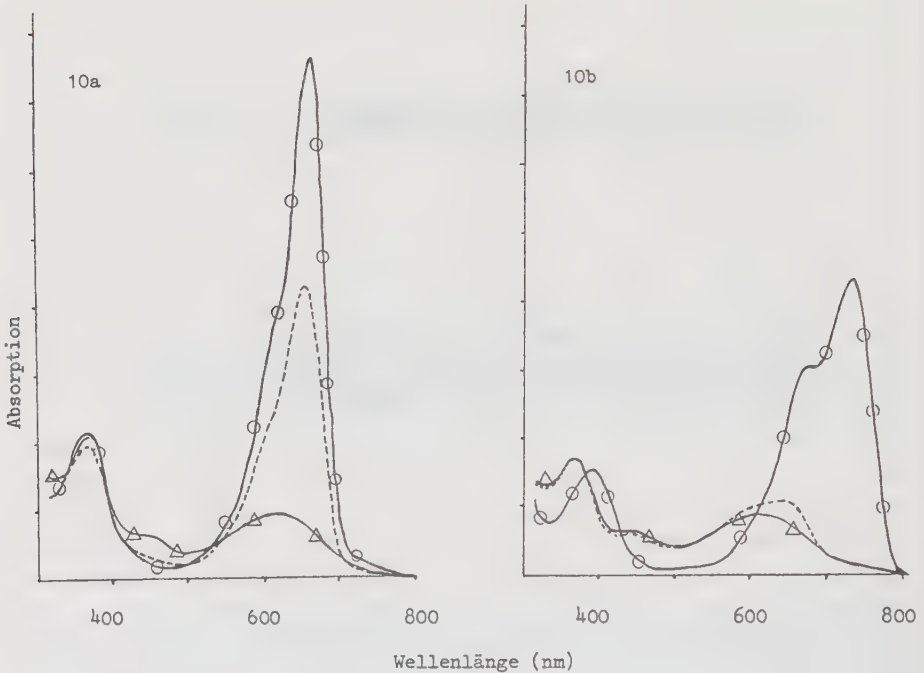


Abb. 10a,b:

Unterschiedliche Entfaltung von Pr (a) und Pfr (b) in 8 M Harnstoff, 1.3 mM DTT;

Absorptionsspektren von aufgereinigtem Phytochrom, $E_{666} = 0.76$, SAR = 0.87.

○—○ I) in der Pr- (Abb. 10a) und Pfr- (Abb. 10b) Form

----- II) nach Ausfällen mit Ammoniumsulfat und Aufnahme des Niederschlags in 8 M Harnstoff, 1.3 mM DTT;

△—△ III) nach Hellrot-Belichtung der Phytochrom-Harnstofflösung

Abbildung 10 zeigt die Absorptionsspektren von Pr und Pfr in 10 mM KPP nach der Aufnahme in 8 M Harnstoff.

Deutlich ist zu sehen, daß bei Pr nach der Aufnahme in Harnstoff die Protein-Chromophorwechselwirkungen noch nicht vollständig aufgehoben sind. Das Absorptionsmaximum zeigt zwar eine Verschiebung von 666 auf 660 nm, die Extinktion vermindert sich jedoch nur auf etwa 55% des ursprünglichen Werts. Erst nach einer Hellrotbestrahlung bildet sich vollkommen gebleichtes, denaturiertes Phytochrom. Eilfeld und Rüdiger (1984) fanden bei ähnlichen Versuchen mit einer Harnstoffkonzentration von 4.8 M ebenfalls die Verschie-

bung des Absorptionsmaximums, die Extinktion verminderte sich jedoch nur um 10 - 15%. Pfr dagegen scheint fast vollkommen denaturiert zu sein. Nach Aufnahme in 8 M Harnstoff zeigt sich, verglichen mit dem Spektrum nach Hellrotbestrahlung, nur eine kleine Schulter bei 650 nm. Dies ist wahrscheinlich auf den Restanteil an Pr zurückzuführen, der auch nach sättigender HR-Bestrahlung vorhanden ist und 14% gegenüber 86% Pfr beträgt (Vierstra und Quail, 1983b).

Das unterschiedliche Verhalten von Pr und Pfr gegenüber Harnstoff als denaturierendem Agens wurde bereits von Butler et al. (1964) für 60kD-, sowie von Thümmel (1984) für 114/118 kD-Phytochrom beschrieben.

Nach den durchgeführten spektralen Untersuchungen und Belichtungsversuchen dürfte dies auch die Ursache für die beobachteten Verschiebungen im Fokussiermuster von Pr gegenüber Pfr sein. Demnach werden bei der vollkommenen Entfaltung des Proteins in der Pr-Form mehr basische als saure Gruppen freigesetzt, der pI dürfte höher sein als der von nur teilweise denaturiertem Phytochrom.

In Abbildung 9 ist auch der pH-Gradient, wie er mit einer Oberflächen-elektrode gleich nach dem Abbruch des IEF-Laufs ermittelt wurde, aufgeführt. Allerdings muß dabei beachtet werden, daß Harnstoff in höherer Konzentration den pK_a von Carboxylgruppen beeinflusst (O'Farrel, 1975). Der Korrektionsfaktor beträgt nach Gianazza (1977) 5/100 einer pH-Einheit pro Einheit Harnstoff Molarität im sauren Bereich und steigt bis auf 7/100 im basischen Ampholytbereich. Der gemessene pI eines Proteins müßte also um diesen Faktor vermindert werden, wird aber durch tiefere Fokussiertemperaturen (bei Harnstoff - gegenüber normalen Gelen) wiederum leicht erhöht (Righetti, 1983). Berücksichtigt man dies, dürfte der pI von vollständig denaturiertem Phytochrom in jenem Bereich, pH 5.9 - pH 5.8, zu bestimmen sein, den auch Vierstra und Quail (1982b) bei ihrer Fokussierung angaben. Teilweise entfaltetes Phytochrom weist einen niedrigeren pI auf. Die in 2.1.3 diskutierte Verschiebung der Banden in nativen Gelen bei zu saurem Auftragspunkt könnte also durch eine partielle Denaturierung zu erklären sein. Bei Harnstoffgelen und Verwendung von in Harnstoff gelösten Pfr-Proben trat dieser Effekt nicht auf. Bei saurem Auf-

tragspunkt drang Phytochrom zwar schlechter in das Gel ein, zeigte aber das normale Bandenmuster und ließ keine Verschiebung erkennen.

2.2.2. Refokussierung

Um das bei der UAIEF auftretende Bandenmuster der Phytochromisoformen zu überprüfen, wurde der klassische Test auf Artefakte bei Auftrennungsverfahren durchgeführt. Die isolierten Zonen werden dabei der angewandten Separationsmethode erneut unterworfen. Entstehen daraus Zonen mit identischen Eigenschaften, können sie als reel betrachtet werden. Wird die Zone in mehrere andere aufgetrennt, oder zeigt abweichende Eigenschaften, muß sie als Artefakt eingestuft werden.

Für diesen Fall bedeutet dies, daß die einzelnen Phytochrombanden nach der Refokussierung das ursprüngliche Muster zeigen sollten. Nach Fixierung in TCA/SSA, bei der die einzelnen Banden erst deutlich sichtbar wurden, waren die Proteinisoformen jedoch nahezu unlöslich geworden. Deshalb wurden nur Randabschnitte des 1.Gels fixiert, danach die Lage der Banden bestimmt und als Gelstreifen ausgeschnitten. Anschließend wurden die Streifen um 90° verdreht auf das 2.Gel gelegt und refokussiert.

Abbildung 11 zeigt ein derartiges Pherogramm.

Abb. 11a,b,c:

Refokussierungs-UAIEF von reinem Phytochrom in 8M Harnstoff, Servalyt 5-7 60%, 6-7 18%, 5-8 6%, 3-10 16%, in einer Endkonzentration von 3.1%, 1.3 mM DTT.

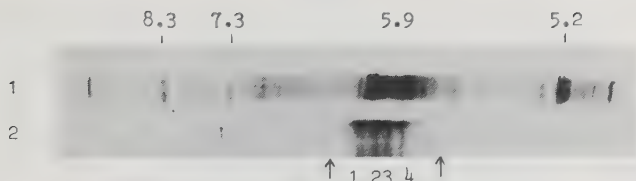


Abbildung 11a zeigt einen Teil des Gels der 1. Fokussierung. Aufgetragen wurde Phytochrom mit $E_{666} = 0.75$, $SAR = 0.84$, das als Pfr gefällt und 2.5 fach konzentriert in 8 M Harnstoff aufgenommen worden war. Die Trennstrecke betrug 10 cm, nach $\frac{1}{2}$ h Entsalzen bei 300 Volt wurde bei 8 W Leistung mit $U_{max.} = 2.5$ kV fokussiert und bei 4700 V·h abgebrochen.

1 = pI-Marker (Serva); 2 = Pfr denaturiert in Harnstofflösung;

Die Pfeile geben die Lage der pI-Markerproteine und deren pI unter nicht denaturierenden Bedingungen an. Die Ziffern 1, 2, 3, und 4 bezeichnen das Phytochrom-Bandenmuster, die sie eingrenzenden Pfeile geben die Lage und Länge der Gelstücke wieder, die für die Refokussierung ausgeschnitten wurden.



Abbildung 11b zeigt das Refokussierungs-Gel. Die Laufbedingungen waren die gleichen wie bei a.

1, = pI-Marker (Serva)

3, 5, = Pfr denaturiert in Harnstofflösung

2, 4, 6, = refokussierte Gelstücke mit Pfr-Isobanden

Die Schemata auf der linken Seite zeigen die Orientierung der Isobanden in den aufgelegten Gelstücken. Bei 2, 4, 6 wurden die Gelstücke in Höhe des pI-Markers 7.3 aufgelegt.

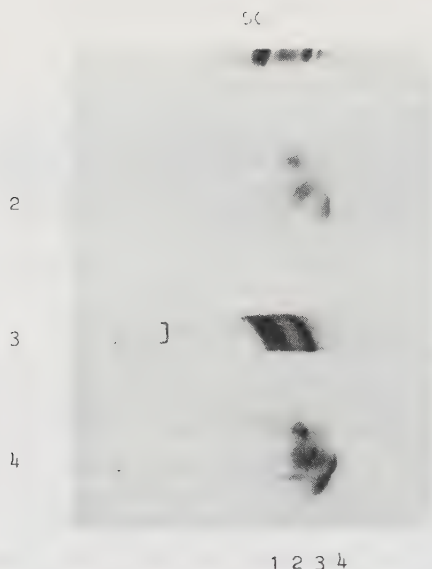


Abbildung 11c zeigt noch einmal die Spuren 2, 3, 4 in stärkerer Vergrößerung, die Ziffern 1, 2, 3 und 4 bezeichnen das spezifische Phytochrom-Bandenmuster.

Es ist deutlich zu sehen, daß die einzelnen Banden nach der Refokussierung ihre ursprüngliche Lage und Orientierung einnehmen. Die mitaufgetragenen Phytochrom-Kontrollproben weisen die gleichen Isobanden auf. Die Gesamtauftrennung ist nicht so fein wie beim Gel in Abbildung 8 [pH 5 - 7 denat. UAIEF], der Doppelcharakter der Banden 1, 2, 3 ist bei den Parallelen nicht so prägnant ausgebildet, wird aber bei den Refokussierbanden deutlich. Die leichte Verzerrung des Gradienten ist auf die aufgelegten Gelstücke zurückzuführen, die an diesen Stellen dadurch zu einer doppelten Geldicke führen. Die enthaltenen Ampholyte wandern mit den Proteinbanden an ihren isoelektrischen Punkt. Dort ist ihre Konzentration verglichen mit den benachbarten Gelpartien dann höher, was eine bessere Auftrennung der Refokussierbanden erklären könnte. Im Bereich der aufgelegten Gelstücke ist sie dagegen niedriger, da sich die hier fokussierenden Ampholyte auf ein größeres Volumen verteilen müssen. In Spur 6 war das Gelstück anders orientiert als in 2 und 4, das Refokussiermuster zeigt ebenfalls das entsprechen-

de, gedrehte Muster.

Die Refokussierung zeigt, daß Artefakte auf Grund von Carbamylierungsreaktionen während des UAIEF-Laufs auszuschließen sind. Wird ein Protein in einer Harnstofflösung erhitzt, werden seine freien Aminogruppen fortschreitend carbamyliert, da Ammoniumcyanat freigesetzt wird (Stark et al., 1960, Olsson und Laas, 1981):



Der Verlust einer freien Aminogruppe unterhalb von pH 8.5 bewirkt eine Ladungsänderung des Moleküls und damit einen niedrigeren pI (Anderson und Hickman, 1979). Wäre dies die Ursache für die beobachteten Phytochrom-Isoformen, hätten sich die Banden nach der Refokussierung erneut weiter in den sauren Bereich hin aufspalten müssen. Dies war nicht der Fall.

Um derartige Reaktionen auszuschließen, waren folgende Vorsichtsmaßnahmen getroffen worden. Bei der Gelzubereitung wurde der kristalline Harnstoff erst nach dem Abkühlen der Gellösung bei 40 - 50° zugegeben. Als Abfänger für Cyanat-Ionen diente außerdem DTT, dessen SH-Gruppen bevorzugt angegriffen werden (Stark et al., 1960), sowie das zugesetzte Ampholytgemisch mit seinen primären Aminogruppen. Der Lauf selbst erfolgte bei 5°C, in diesem tiefen Temperaturbereich ist die Konzentration an Cyanat wegen der Gleichgewichtslage sehr gering. Außerdem wurden durch die Vorfokussierung vorhandene Cyanat-Ionen, pK_a = 3.75, entfernt (O'Farrell, 1975). Agarose-Gele, die nach dem Trocknen mit kaltem Harnstoff-Ampholytgemisch nachgequollen wurden (auf diese Weise erfolgte keine Erwärmung der Harnstofflösung) zeigten ebenfalls das typische Fokussiermuster von denaturiertem Phytochrom. Dies ist in Abbildung 11d (Spuren A,C) zu sehen. In Spur B sollte zudem der Effekt der Carbamylierung von Phytochrom in heißer Harnstofflösung dokumentiert werden (90 min bei 70°C in 8.9 M Harnstoff), was an der starken Bandenverschiebung auch gut zu erkennen ist.

A

B

C

1 2 3 4

Abb.11d: UAIEF von Phytochromproben; das Gel wurde ohne Harnstoffzugabe gegossen, dann luftgetrocknet und wieder in Harnstoff-Ampholinlösung gequollen, Servalyt 5-7 80%, 3-10 20%, 8M Harnstoff, 1.3 mM DTT, Trennstrecke 10 cm, Fokussierungsdauer 7200 V·h, $U_{max}=2.8$ kV.

A: Pr in 8.9 M Harnstoff, 2.6 mM DTT, 1% Triton, SAR=0.91;

B: Pfr in 8.9 M Harnstoff, 90 min bei 70°C inkubiert;

C: Pfr in 8.9 M Harnstoff, 2.6 mM DTT, 1% Triton, SAR=0.91;

Auch bei der Probenzubereitung wurde Rücksicht auf das Carbamylierungsrisiko genommen. Harnstofflösungen wurden frisch zubereitet, mit DTT versetzt und dann in Aliquots eingefroren. Proteine wurden darin erst kurz vor dem UAIEF-Lauf aufgenommen und nach dem Auftrag eingefroren oder verworfen.

Das Ergebnis der Refokussierung spricht auch gegen eine Komplexbildung von Carrierampholyten mit Phytochrom, oder verschiedener stabiler Konformationen von Phytochrom in 8 M Harnstoff, da in beiden Fällen auch eine weitere Aufspaltung der Einzelbanden zu erwarten gewesen wäre.

2.2.3. 2D-Gele und denaturierende isoelektrische Fokussierung in Acrylamidgelen

Als weitere Möglichkeit für die auftretenden Isoformen war noch in Betracht zu ziehen, daß Phytochrom während der Fokussierung durch spontane Proteolyse in Fragmente zerlegt wird, die dann die verschiedenen Banden bilden könnten. Vor dem IEF-Lauf waren die Proben durch Spektroskopie und SDS-PAGE auf ihre Reinheit überprüft worden und nur einwandfreie Phytochrompräparationen ($SAR > 0,8$, 124 kD MW) wurden eingesetzt, so daß die auftretende Heterogenität nicht auf bereits proteolytisch degradiertes Ausgangsmaterial beruhen konnte.

Abbildung 12 zeigt die 2-dimensionale Auftrennung einer Phytochromprobe, die also zuerst einer UAIEF und dann einer SDS-PAGE unterzogen worden war.

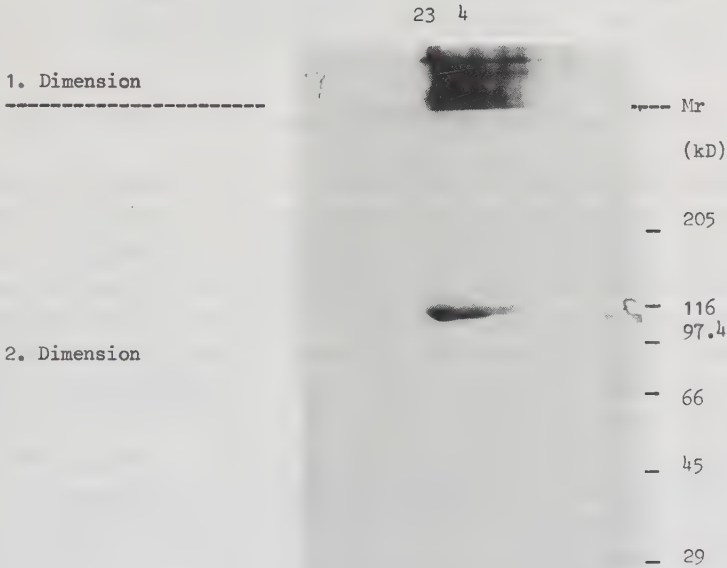


Abb. 12: 2-dimensionale Auftrennung von Phytochrom

1.Dimension: UAIEF von Phytochrom in 8 M Harnstoff, Servalyt 6-7 70%, 3-10 30%, Endkonzentration 2.5%, 1.3 mM DTT; Aufgetragen wurde Phytochrom mit $E_{666} = 0.9$, SAR = 0.91, das als Pr ausgefällt und 2-fach konzentriert in 8 M Harnstoff, 1.3 mM DTT aufgenommen wurde. Die Trennstrecke betrug 16 cm, nach Vorfokussierung bis 3500 V·h wurde aufgetragen und bei 8300 V·h abgebrochen. Die Zahlen bezeichnen Art und Lage der Banden.

2.Dimension: SDS-PAGE in linearem Gradientengel 7.5 - 15%. Die Pfeile geben das Molekulargewicht und die Lage der Markerproteine an.

Die Fokussierung zeigt dabei noch einmal deutlich, daß Pr in 8 M Harnstoff ohne HR- oder WL-Bestrahlung nur teilweise denaturiert wird. Im Muster fehlen die Bandenpaare 1 vollständig, 2 ist nur

schwach vorhanden. Dafür sind neben Nummer 4 noch weitere Banden im sauren vorhanden, die offensichtlich dem nur teildenaturierten Anteil entsprechen (siehe auch 2.2.1.). In der 2.Dimension, der SDS-PAGE, wird deutlich, daß alle Banden dasselbe Molekulargewicht aufweisen und keine proteolytischen Abbauprodukte auftreten. Dies war ebenfalls für vollkommen denaturiertes Phytochrom der Fall.

Denaturierende isoelektrische Fokussierung in Acrylamidgelen

Es wurde auch versucht, Phytochrom in Acrylamid-Flachgelen zu fokussieren. Gegenüber Agarose-Gelen kann man folgende Vorteile anführen: die Harnstofflösung muß nicht erwärmt werden; es sind noch höhere Fokussierspannungen möglich; hohe Detergentienzusätze beeinflussen die Gelstabilität kaum. Es ergeben sich jedoch auch folgende Nachteile: Monomeres Acrylamid ist sehr giftig. Reste des Katalysators und unpolymerisiertes Acrylamid können im Gel zurückbleiben. Es kann kein Reduktionsmittel wie DTT oder β -ME zugefügt werden (sonst unterbleibt die Polymerisation). Färben, Entfärben und Trocknen des Gels sind langwierig und problematisch. Der größte und folgenschwerste Nachteil dürfte jedoch der auftretende Siebeffekt sein (Stromska, 1982; Hirabayashi, 1981). Proteine mit höherem Molekulargewicht dringen nur schlecht in die enge Porenmatrix von Acrylamidgelen ein, erreichen ihren pI nicht oder brauchen dazu sehr lange Fokussierzeiten. Zusätzlich wird bei der Entfaltung von Polypeptiden ihr Stokes Radius stark erhöht, was diesen Siebeffekt noch verstärken dürfte.

Diese Schwierigkeiten traten dann auch bei Acrylamid-Flachgelen auf. Das aufgetragene Phytochrom präzipitiert großteils auf dem Auftragspunkt. Eingedrungene Spuren zeigten zwar mehrere Banden, erreichten aber, verglichen mit dem mitlaufenden pI-Marker, nicht ihren IEP.

Als Ausweg aus dieser Problematik wurde Phytochrom direkt in das Gel mit einpolymerisiert und mit hohen V·h-Produkten fokussiert. Abbildung 13 zeigt ein derartiges Gel.

Kathode

Anode

1 2 3 4

Abb. 13: Acrylamid-IEF von aufgereinigtem Phytochrom in 8 M Harnstoff, Servalyt 4-9 T 100% in einer Endkonzentration von 3%. Einpolymerisiert wurde Phytochrom mit $E_{\text{eff}} = 0.7$, SAR = 0.83, das in Harnstofflösung 8.9 M, 3% Servalyt aufgenommen worden war. Pro 10 ml Gellösung wurden 300 µg Protein zugegeben. Die Trennstrecke betrug 19 cm, nach $\frac{1}{2}$ h Entsalzen bei 200 V max. wurde bei 7 W Leistung mit $U_{\text{max.}} = 2$ kV fokussiert und bei 16.000 V·h abgebrochen. Die Ziffern bezeichnen das Bandenmuster.

Auch bei dieser Art der Auftrennung zeigten die einzelnen Banden bei einer folgenden SDS-Gelelektrophorese als 2. Dimension ein Molekulargewicht von 124 kD. Das Muster entspricht dem von UAIEF-Gelen, außer daß die Doppelbande 2 nicht so deutlich getrennt aufgelöst wird.

2.2.4. Fokussierung von Rohextrakten und Nachweis der Phytochromisobanden über Immunoblotanalyse

Während der Extraktion und der Aufreinigung von Phytochrom könnte es zu Modifikationen des Proteins kommen, die somit auch als Ursache für die beobachteten Isobanden in Betracht zu ziehen waren.

Über Immunoblotanalyse war es möglich, bereits aus Rohextrakten nach der Polyethyleniminfällung (um Nukleinsäuren, die die Fokussierung stören, auszufällen) Phytochrombanden spezifisch nachzuweisen. Zur Herstellung derartiger Präparate sind nur wenige Keimlinge oder auch isolierte Keimlingsabschnitte als Ausgangsmaterial notwendig, die Verarbeitungszeit kann sehr kurz gehalten werden, neben Phytochrom selbst sind noch viele andere Polypeptide

vorhanden, die als Schutzgruppen vor möglicher Proteinmodifikation auch während des UAIEF-Laufs wirken können.

2.2.4.1. Fokussierung von Extrakten aus HR bestrahlten und unbelichteten Koleoptilen

Abbildung 14 zeigt den Immunoblot eines Fokussierungsgels, bei dem 2 Koleoptilextrakte aufgetrennt wurden. Dabei wurden die Koleoptilen unter Grünlicht geerntet, eine Hälfte davon anschließend 5 Minuten HR bestrahlt, die andere dagegen nicht. Nach der Extraktion und Aufnahme in Harnstoff/DTT-Lösung wurden beide Lösungen noch einmal 10 Sekunden mit WL bestrahlt, um Phytochrom möglichst vollständig zu denaturieren. Ausgangspunkt für diesen Versuch waren Überlegungen, ob nicht bereits die Belichtung mit HR vor der Extraktion der Keimlinge zu Modifikationen des Phytochrom-Proteins führt, die sich auch in einem differentiellen Fokussierungsmuster bei der UAIEF manifestieren. Diese HR-Bestrahlung wandelt Pr in Pfr um, das gegen den Abbau durch endogene Proteasen nach der Extraktion stabiler ist als Pr. Sie ist ein wesentlicher Bestandteil jener Anreicherungsmethoden, die auf der Vorschrift von Vierstra und Quail (1983a) beruhen. Durch diese Belichtung wird jedoch auch in vivo die intrazelluläre Konzentration von Pfr in bestimmten Bereichen (=Sequestering) ausgelöst, die sich in der Zeit bis zur Homogenisation des Gewebes noch verstärkt (Mackenzie et al., 1975, 1978, Mc Curdy und Pratt, 1986). Ubiquitin konnte in diesen Bereichen allerdings erst 30 Minuten nach HR-Belichtungsende gefunden werden (Speth et al. 1987). Nach dieser Zeit sollte die Extraktion der Keimlinge bereits abgeschlossen sein. Dennoch könnte dieser Vorgang der Pfr-Ansammlung in der Zelle von Modifikationen dieses Proteins begleitet sein. Auch ist die unterschiedliche Empfindlichkeit von Pr und Pfr gegenüber chemischen und enzymatischen Einflüssen wohl bekannt (Lagarias und Mercurio, 1985; Wong et al. 1986). Lagarias et al. (1987) halten auch die Modifikation von Phytochrom in der Pfr-Form dafür verantwortlich, daß die Pr-, Pfr-Absorptionsspektren von aus HR bestrahlten und unbelichteten Keimlingen nicht vollkommen übereinstimmen.

Allerdings lassen sich im Bandenmuster zwischen den beiden Proben,

DK-Kol und HR-Kol, keine Unterschiede feststellen. Deutlich ist das 1, 2, 3, 4 Muster zu erkennen. Es ist jedoch zu beachten, daß die Färbung der geblotteten Banden nicht linear zur tatsächlichen Proteinmenge verläuft, dies ist nur für einen engen Konzentrationsbereich gegeben (siehe auch Material und Methoden, Punkt 7, Jones et al., 1986, sowie Tokuhisa und Quail, 1987). Deshalb sind quantitative Aussagen über Mengenverhältnisse der einzelnen Banden zueinander problematisch, wenn die Konzentration eines Isoproteins nicht mehr im linearen Bereich der Enzymfarbreaktion liegt. Dies mag der Grund dafür sein, daß auch Nebenbanden in saurer und basischer Umgebung der Hauptisoformen deutlich hervortreten. Der Anteil der Banden im sauren dürfte, wie bereits unter 2.2.1 diskutiert, auf nicht vollständig entfaltete Proteine entfallen. Auch an geringe Mengen von Abbaupeptiden, die bei der ebenfalls durchgeführten SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Immunoblotanalyse nur in Spuren zu detektieren waren, ist zu denken.

Es kann aber auch nicht vollkommen ausgeschlossen werden, daß die Aufreinigungsprozedur selektiv gewisse Phytochromisoformen anreichert. Bei einem Auftrag in geringerer Konzentration traten allerdings nur die bekannten Hauptbanden auf.

Noch einmal zu erwähnen bleibt, daß, sollte Phytochrom aus HR bestrahlten oder unbelichteten Keimlingen unterschiedlichen Modifikationen unterworfen sein, sich diese nicht in differenten Fokussierungsmuster nachweisen lassen.

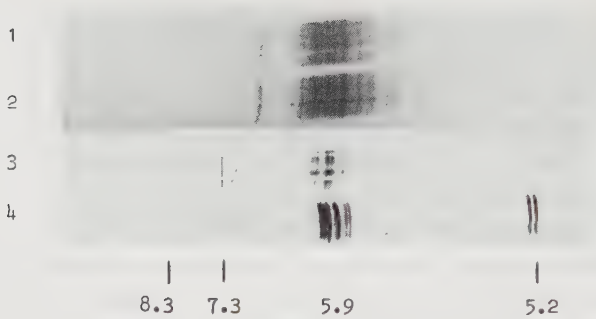


Abb. 14: UAIEF-Immunoblot von Rohextrakten aus unbelichteten und HR-bestrahlten Koleoptilen von Hafer, in 8 M Harnstoff, Servalyt 5 -7 80%, 3-10 20%, Endkonzentration 2.5%, 1.3 mM DTT, Trennstrecke 10 cm;

Aufgetragen wurden Rohextrakte von Koleoptilen, die erst kurz vor der Fokussierung in 8M Harnstoff, 1.3 mM DTT aufgenommen worden waren, sowie Kontrollphytochrom und pI-Marker.

Nach Kapillarblot wurden phytochromspezifische Banden mit den monoklonalen Antikörpern FD4 und Z4B5 (Schwarz und Schneider, 1987) detektiert und angefärbt.

- 1 = Extraktion aus HR-bestrahlten Koleoptilen (NC-Blot)
- 2 = Extraktion aus unbelichteten Koleoptilen (NC-Blot)
- 3 = Kontroll-Phytochrom (getrocknetes, gefärbtes Gel)
- 4 = pI-Marker (Serva) (getrocknetes, gefärbtes Gel)

2.2.4.2. Fokussierung von Extrakten, die unter stark reduktiven Bedingungen hergestellt wurden

Als weitere Ursache für Proteinmodifikationen in vitro aber auch in vivo kommen pflanzliche Phenole, die hauptsächlich in der Vakuole lokalisiert sind, in Betracht. Bei der Extraktion werden die zellulären Strukturen zerstört, die freigesetzten Phenole können durch oxidative Enzyme wie Peroxidase, Polyphenoloxidase und Laccase zu Quinonen und freien Radikalen umgewandelt werden, die wiederum mit anderen Phenolen kondensieren, oder aber mit den nukleophilen Amino- oder Sulfhydrylgruppen von Proteinen reagieren können (Leatham et al., 1980). Auf diese Weise ist es möglich, daß Phenole sowie Polyphenole kovalent an Polypeptide binden, oder

diese sogar vernetzen. Cha et al. (1984) fanden an 124 kD Haferphytochrom teilweise eine gesteigerte Absorption bei 320 nm, die sie einem unbekannten, gebundenen Chromophor "X" zuschreiben, der phenolischen Ursprungs sein soll. Chai et al. (1987a) führten ähnliche Untersuchungen mit hochgereinigten Proben durch und berichten ebenfalls von einer Kontaminante "X". Auch sie halten ein gebundenes Pflanzen-Polyphenol für den Verursacher. Vollkommen "X"-freies Phytochrom soll demnach durch einen Zusatz von β -ME im Extraktionspuffer aufzureinigen sein, das als Abfänger für auftretende Quinone und Radikale wirkt. Derartige Modifikationen könnten nun auch als Ursache für die auftretende Heterogenität von Phytochrom bei der IEF anzusprechen sein.

Aus diesem Grund wurden Rohextrakte aus Keimlingen unter Verwendung von Homogenisationspuffer mit 140 mM β -ME Anteil hergestellt. Nach Vierstra und Quail (1983a) enthält dieser Puffer sonst nur Natriumbisulfit als Reduktionsmittel.

Abbildung 15 zeigt den Immunoblot der Fokussierung.

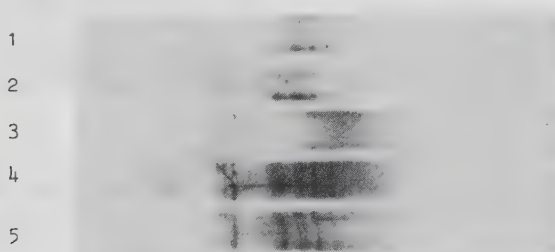


Abb. 15: UAIEF-Immunoblot von Rohextrakten aus Haferkeimlingen in 8M Harnstoff, Servalyt 5-7 60%, 6-7 18%, 5-8 6%, 3-10 16% in einer Endkonzentration von 3,1%, 1,3 mM DTT, Trennstrecke 10 cm. Aufgetragen wurden unterschiedliche Rohextrakte, die erst unmittelbar vor der Fokussierung in 8M Harnstoff, 1,3 mM DTT aufgenommen worden waren. Nach Kapillarblot wurden phytochromspezifische Banden mit den monoklonalen Antikörper Z3B1 (Schwarz und Schneider, 1987) detektiert und angefärbt.

1 = Extrakt aus unbehandelten Keimlingen (Kontrolle)

2 = Extrakt aus GABA inkubierten Keimlingen

3 = Pr-Standard

4 = Standardhaferextrakt mit 140 mM ME im Extraktions-Puffer

5 = Garry-Haferextrakt mit 140 mM ME im Extraktions-Puffer

Vergleicht man das Bandenmuster von Spur 4 und 5 untereinander und mit den Koleoptilextrakten in Abbildung 14 ergibt sich kein auffallender Unterschied. Auch mit Spur 1, wo ein Kontrollextrakt, ohne β -ME im Homogenisationspuffer aufgetragen wurde, stimmt die Lage der Hauptbanden überein. Hier war außerdem die Proteinkonzentration der Probe nicht so hoch, es treten nur die Banden 1, 2 und 3 deutlich hervor, was dem bekannten Muster aufgereinigter Phytochrompräparationen entspricht. Die Standardprobe selbst, Spur 3, zeigt nur eine verschwommene Verteilung, die Ursache dafür ist nicht bekannt. Auf das Muster des Extrakts aus GABA inkubierten Keimlingen soll in einem späteren Unterpunkt (2.2.7.1.) eingegangen werden. Als Ergebnis dieser Versuche läßt sich sagen, daß phenolische Modifikationen mit großer Wahrscheinlichkeit nicht die Ursache der auftretenden Phytochromisobanden sind.

2.2.4.3. Fokussierung von Extrakten unterschiedlicher Hafersorten

Zusätzlich zur Verwendung von Extraktionspuffer mit hohem β -ME Gehalt wurde auch geprüft, ob das Phytochrom-Isobandenmuster bei 2 unterschiedlichen Hafersorten gleich ausfällt, oder möglicherweise Abweichungen aufweist. Die Abbildungen 16a,b zeigen den Immunoblot und ein Coomassie-gefärbtes Gel einer derartigen Auftrennung. Es wurden Rohextrakte (siehe 2.2.) aus unserem Standardhafer, Sorte Pirol, sowie dem Standardhafer der Arbeitsgruppe von Peter Quail, Sorte Garry Oat, hergestellt und fokussiert.

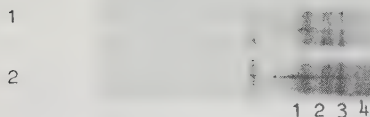


Abb. 16a: UAIEF-Immunoblot von Rohextrakten aus 2 verschiedenen Hafersorten in 8M Harnstoff, Servalyt 5-7 60%, 6-7 18%, 5-8 6%, 3-10 16% in einer Endkonzentration von 3.1%, 1.3 mM DTT, Trennstrecke 10 cm.

Aufgetragen wurden unterschiedliche Rohextrakte, die erst unmittelbar vor der Fokussierung in 8M Harnstoff, 1.3 mM DTT aufgenommen worden waren.

Nach Kapillarblot wurden phytochromspezifische Banden mit den monoklonalen Antikörper Z3B1 (Schwarz und Schneider, 1987) detektiert und angefärbt.

1)= Garry-Haferextrakt

2)= Standard-Haferextrakt

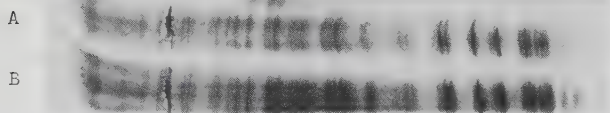


Abb. 16b: UAIEF-Gel von Rohextrakten aus 2 verschiedenen Hafersorten in 8M Harnstoff, Servalyt 5-7 80%, 3-10 20% in einer Endkonzentration von 2.5%, 1.3 mM DTT, Trennstrecke 10 cm.

Das Gel wurde Coomassie-gefärbt.

A)= Garry-Haferextrakt

B)= Standard-Haferextrakt

Das Coomassie-gefärbte Gel zeigt deutlich die Vielfalt der Proteine mit ihren unterschiedlichen IEP's, wie sie in nur partiell aufgereinigten Rohextrakten neben Phytochrom vorhanden sind. Auch ist zu erkennen, daß im Gesamt-Protein-Bandenmuster zwischen den beiden Hafersorten keine wesentlichen Unterschiede bestehen.

Durch die Immunoblotanalyse werden aus dieser Vielfalt von Proteinen phytochromspezifische Polypeptide hervorgehoben. Es lassen sich jedoch auch keine Unterschiede im Phytochrom-Isobandenmuster der 2 Hafersorten feststellen. Das deutet darauf hin, daß die Phy-

tochromisoformen der beiden Sorten nicht, oder nur sehr geringfügig voneinander abweichen und eine gleiche Ladungsverteilung aufweisen.

2.2.4.4. Fokussierung von Extrakten aus unterschiedlichen Pflanzenorganen

Im Haferkeimling kann Phytochrom in den verschiedensten Geweben und Organen detektiert werden. Andererseits ist die mengenmäßige Verteilung doch sehr ungleich. Den höchsten Gehalt weisen Koleoptilspitze und Koleoptilknoten auf. Im Primärblatt dagegen ist sehr viel weniger Phytochrom lokalisiert, und in der Primärwurzel ist Phytochrom nur in der Wurzelhaube in vergleichbar geringen Mengen zu finden (Pratt und Coleman, 1971, sowie zusammengefaßt bei Pratt, 1986).

In dieser Hinsicht erschien es interessant, zu überprüfen, ob sich Phytochrom aus differenten Pflanzenteilen in seinem Isobandenmuster unterscheidet. Dazu wurden Rohextrakte aus Koleoptilen, Primärblättern und Wurzelspitzen von etiolierten Haferkeimlingen hergestellt, über UAIEF aufgetrennt und einer Immunoblotanalyse unterzogen.

Abbildung 17 zeigt das Ergebnis:

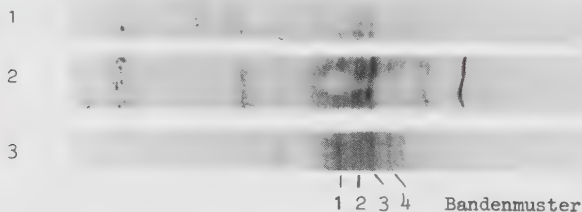


Abb. 17: UAIEF-Immunoblot von Rohextrakten aus Koleoptilen, Primärblättern und Wurzelspitzen von etiolierten Haferkeimlingen, in 8 M Harnstoff, Servalyt 5 -7 80%, 3-10 20%, Endkonzentration 2.5%, 1.3 mM DTT, Trennstrecke 10 cm; Aufgetragen wurden Rohextrakte dieser Pflanzenteile, die erst kurz vor der Fokussierung in 8M Harnstoff, 1.3 mM DTT aufgenommen worden waren. Nach Kapillarblot wurden phytochromspezifische Banden mit den monoklonalen Antikörpern FD4 und Z4B5 (Schwarz und Schneider, 1987) detektiert und angefärbt.

- 1) = Wurzelspitzenextrakt
- 2) = Primärblattextrakt
- 3) = Koleoptilextrakt

Bei allen 3 Extrakten stimmt demnach die Lage der Hauptbanden und das Muster überein. Gut ist auch bei den Wurzelspitzen zu sehen, daß bei niedrigem Phytochromgehalt nur die Bandenpaare 1,2,3 deutlich hervortreten. Die zusätzlichen Bande bei den Primärblättern (im saureren Bereich der Hauptbanden) und bei den Koleoptilen (im basischeren Bereich der Hauptbanden) dürfte auf Spaltpeptide von Phytochrom zurückzuführen sein. Unter Berücksichtigung dieser Umstände bleibt festzuhalten, daß keine organspezifischen Phytochrom-Isobandenmuster festgestellt werden konnten.

2.2.5. Spaltstellenkartierung der Isoformen

Hershey et al.(1985) leiteten die vollständige Aminosäuresequenz von Haferphytochrom über die Analyse von c-DNA und genomischer DNA ab. Dabei fanden sie, daß in Hafer mindestens 4 verschiedene Phytochromgene exprimiert werden. Sie konnten die Struktur von 2 Genen (AP3 und AP4) vollständig und von einem (AP5) teilweise aufklären. Mindestens 80% aller identifizierten Phytochromklone waren AP4 und AP5 zuzuordnen. Die Homologie der daraus abgeleiteten Proteinsequenzen ist sehr hoch und beträgt 98%. Der Austausch der Aminosäuren unter den Genprodukten ist stark konservativ. Maßgeblich für den IEP eines Proteins ist die Anzahl und Verteilung der Aminosäuren mit geladenen Seitenketten, also Lys, Arg, His, die positive Ladungen liefern, sowie Asp und Glu mit negativer Ladung. Vergleicht man die Genprodukte AP3 und AP4 hinsichtlich dieser Eigenschaft, ergeben sich folgende Unterschiede: Typ 4 weist 2 positive Ladungen mehr auf, die von den basischen Aminosäuren His und Arg hervorgerufen werden. Sie sind bei AP3 durch neutrale Aminosäuren ersetzt, weshalb der IEP geringfügig weiter im sauren liegen sollte als bei AP4. Zudem besitzt Typ 3 in seiner Peptidkette 2 Asp-Pro Bindungen, während Typ 4 nur eine aufweist. Diese Peptidbindung ist ziemlich säureempfindlich und kann durch Behandlung mit Ameisensäure (Sonderegger et al.,1982) oder auch durch Kochen in SDS-haltigen Puffern (Rittenhouse und Marcus, 1984) bevorzugt hydrolysiert werden. Sind beide Genprodukte in aufgereinigten Phytochromproben enthalten und entsprechen unterschiedlichen Banden in der UAIEF, sollte es möglich sein,

sie durch ihre abweichenden Spaltprodukte zu identifizieren. Abbildung 18 zeigt ein Modell des Phytochromproteins mit den entsprechenden Asp-Pro Spaltstellen von AP3 und AP4.

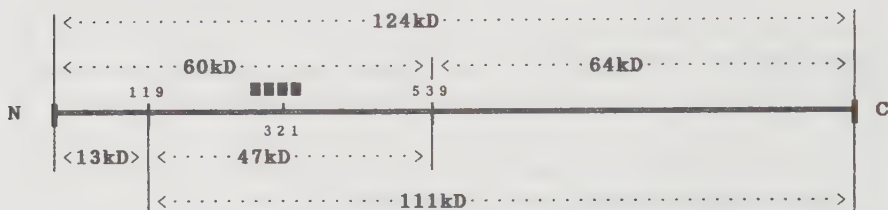


Abb.18: Asp-Pro Spaltstellenkarte der Phytochromgenprodukte AP3 und AP4; Es sind die Aminosäurepositionen der beiden Asp-Pro Bindungen und der Anheftungsstelle des Chromophors (■■■■) angegeben. Aufgeführt sind auch die Molekulargewichte der zu erwartenden Spaltpeptide.
 AP4: Spaltstelle bei Aminosäureposition 119;
 AP3: Spaltstelle bei Aminosäureposition 119 und 539;

Wurde diese Spaltungsmethoden jedoch auf reine Phytochromproben oder aber ausgeschnittene Isobanden aus Agarosegelen angewandt, konnten eine große Vielfalt von Peptiden über anschließende SDS-PAGE aufgetrennt werden. Bei einer Kinetik mit reinem Phytochrom konnten bereits nach einer vorausgehenden Gefriertrocknung des Präparats dadurch verursachte Abbauprodukte festgestellt werden. Die Hauptbanden liegen bei 88, 85 und 78 kD, sowie 70 kD, 60 kD und 39 kD, 31 kD. Bei zunehmender Zeit der Inkubation bei 63°C in 75% Ameisensäure verstärken sich diese Banden, das native 124 kD Protein nimmt ab, zusätzlich entstehen 34 kD, 56 kD, 53 - 51 kD, 46 kD, 23 kD und 110 kD Peptide (Abbildung 19).

Beim Säureabbau von isolierten Isobanden im Agarose-Gel waren ähnliche Verhältnisse zu beobachten.

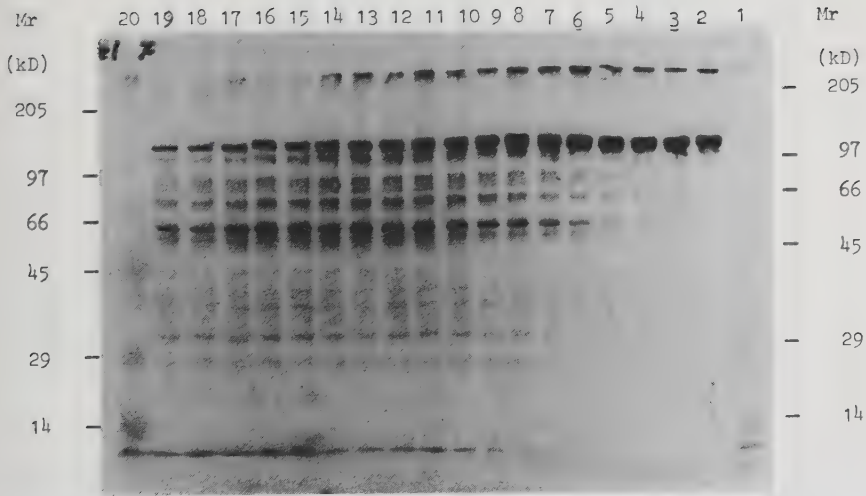


Abb. 19: Abbaukinetik von aufgereinigtem Phytochrom mit 75% HCCOOH bei 63°C; Phytochrom, SAR = 0.85, wurde in 75% Ameisensäure aufgenommen (bei WL) und bei 63°C inkubiert. In 5 Minuten-Abständen wurden daraus Proben gezogen und nach anschließender Gefriertrocknung in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Peptide wurden über SDS-PAGE, 10% Acrylamidkonzentration und anschließendem Immunoblot mit polyklonalen Antikörpern aufgetrennt und angefärbt. Die Pfeile geben die Lage und das Molekulargewicht der benutzten Marker an.

- 1 u. 20 = SDS-Molekulargewichtsmarker
- 2 = Phytochrom
- 3 = Phytochrom nach Gefriertrocknung
- 4 = Phytochrom + HCCOOH O-Wert
- 5 = 5'Wert
- 6 = 10'Wert usw.
- 19 = 75'Wert

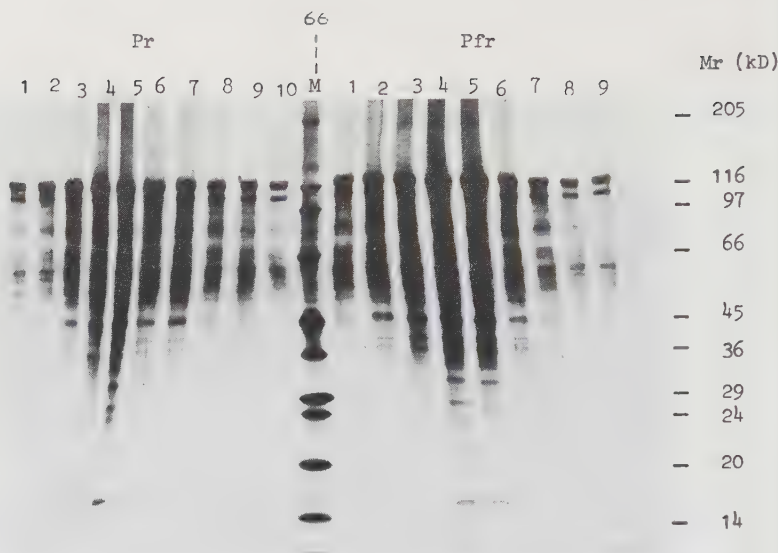


Abb. 20: SDS-Kochabbau von einzelnen Phytochrom-Fokussierungs-isobanden.

Die einzelnen Banden wurden aus der UAIEF von Abbildung 9 isoliert, 1 Stunde in SDS-Probenpuffer gekocht und dann über SDS-PAGE, linearer Gradient 7.5 - 15% Acrylamidkonzentration aufgetrennt und das Gel silbergefärbt. Rechts sind die Molekulargewichte von Markerproteinen angegeben. Links vom Mix-Marker (=M) wurden die Banden von Pr in Harnstoff, rechts davon die von Pfr in Harnstoff aufgetragen. Die Benennung der Banden erfolgte vom basischen zum sauren Bereich;

1, 2 = Bandenpaar 1; 3, 4 = Bandenpaar 2;

5, 6 = Bandenpaar 3; 7, 8 = Bandenpaar 4;

9, 10 weitere Banden (nicht vollkommen denaturiertes Phytochrom);

Abbildung 20 zeigt ein Beispiel für einen derartigen Abbau von Phytochrom-Isoformen.

Dazu wurden Banden aus dem Fokussierungsgel der Abbildung 9 geschnitten, 1 Stunde im Probenpuffer gekocht und dann über SDS-PAGE aufgetrennt.

Das Hauptspaltprodukt bildete ein 110 kD Peptid, das mengenmäßig stark hervortrat. Darauf folgte eine 61 - 60 kD Doppelbande und ein 58 kD Peptid sowie 85 kD und 46 kD-Banden. Als weitere, sich nicht so stark akkumulierende Abbauprodukte wären noch Peptide bei 105 und 100 kD, 88 und 78 kD, 70 und 66 kD, 56 und 54 kD, 50 kD sowie 39, 37 - 34 kD, 31, 28 und 15,3 kD zu nennen.

Vergleicht man das Peptidmuster der einzelnen Isobanden, können

keine auffälligen Unterschiede festgestellt werden.

Die Vielfalt an Spaltstücken zeigt wie auch beim Ameisensäureabbau, daß nicht ausschließlich Asp-Pro Bindungen angegriffen wurden. Auffallend ist jedoch die Dominanz der 110 kD Bande beim SDS-Kochabbau der Isobanden, die in ihrem Molekulargewicht durchaus der 1. Asp-Pro Spaltstelle zuzuordnen wäre. Allerdings ist das hierzu korrespondierende kleine 13 kD Peptid nicht aufzufinden. Dieses Muster entspräche wie bereits erläutert dem des Genprodukts von AP4. Bei AP3 wären zusätzlich weitere Peptide bei 64 kD, 60 kD und 47 kD zu erwarten, wobei das 64 kD Stück, da es nicht weiter gespalten werden kann wie die 110 kD und 60 kD Peptide, eine vergleichsweise höhere Anreicherung zeigen sollte. Diese theoretisch zu erwartenden Verhältnisse konnten nicht bestätigt werden. Stattdessen war eine relativ zu den übrigen Peptiden (außer dem 110 kD Stück) erhöhte Menge der 61-60-58 kD Dreierbande zu beobachten. Andererseits könnte das ebenfalls deutlich auftretende 46 kD Peptid mit dem theoretisch zu erwartenden 47 kD Stück identisch sein. Offensichtlich ist jedoch, daß das Genprodukt von AP3 mit den 2 Asp-Pro Spaltstellen nach diesen Ergebnissen mengenmäßig stark hinter AP4 zurücktritt, was auch Hershey et al. (1985) aus der unterschiedlichen Frequenz von AP3, AP4 und AP5 in den von ihnen isolierten DNA Klonen geschlossen haben. Zusätzlich dazu konnte R. Grimm (persönliche Mitteilung sowie Dissertation) bei der Mikrosequenzierung eines 600 Aminosäuren langen, durch Trypsinabbau gewonnenem Phytochrombruchstücks, das beide Asp-Pro-Bindungen überdeckte, nur die vordere Schnittstelle nachweisen. Ursache für die Spaltung dieser Asp-Pro-Bindung, die eigentlich nicht beabsichtigt war, dürfte eine Lagerung der Proteinbanden in saurem Milieu für 2 Monate sein, bevor die Mikrosequenzierung durchgeführt wurde. Bereits 1970 berichteten Piszkiwicz et al. von der besonderen Empfindlichkeit der Asp-Pro Bindung gegenüber niederen pH-Werten. Auch durch eigene Beobachtungen konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Bei Phytochromisobanden, die aus einem Gel isoliert wurden, welches 3 Wochen bei 4°C in essigsaurer Entfärbelösung gelagert worden war, traten in der 2. Dimension bei SDS-PAGE deutlich 110 kD Abbaupeptide auf, die am Tage der Fokussierung noch nicht vorhanden waren. Daneben konnten jedoch keine weiteren Peptide,

insbesondere vom Mr 64, 60 und 47 kD nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß das Genprodukt von AP3 in aufgereinigten Phytochrompräparationen gar nicht oder nur in Spuren vorkommt. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, daß die 2. Asp-Pro-Bindung nicht so labil ist, wie die 1., näher beim N-Terminus liegende Stelle, was durch die umgebenden Aminosäuren und die Faltung des Proteins bedingt sein könnte. Die bei den angewendeten Abbaumethoden zusätzlich zum 110 kD Stück aufgetretenen Peptide dürften dann das Produkt nicht Asp-Pro-Bindungen betreffender Spaltungsreaktionen sein.

Es bleibt jedoch weiterhin festzuhalten, daß bei den angewendeten Methoden im Peptidmuster zwischen den einzelnen Isobanden keine prägnanten Unterschiede festgestellt werden konnten. Dies war auch der Fall, wenn der Abbau mit Trypsin oder V-8 Protease durchgeführt wurde (nicht beschrieben).

2.2.6. Untersuchungen zum Nachweis posttranslationaler Modifikationen als Ursache der Heterogenität

Viele Proteine liegen nach ihrer Synthese an den Ribosomen noch nicht in ihrer physiologisch richtigen oder "aktiven" Form vor. Als erste, posttranslationalen Modifikation wird meist die N-terminale Aminosäure Methionin oder Formyl-Methionin (in den Plastiden und Mitochondrien) abgespalten. Dies wird für das Phytochromprotein angenommen (Hershey et al., 1985), konnte aber bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden, da beim Edman-Abbau der 124 kD Polypeptidkette keine derivatisierten Aminosäuren detektiert werden konnten (Vierstra und Quail, 1983a). Dies spricht für einen blockierten Aminoterminus, der durch eine posttranslationalen Modifikation entstanden sein könnte, falls Methionin als Initiationsaminosäure abgespalten wird, und Serin dann N-terminal steht. Er könnte aber auch durch Formylmethionin verursacht sein, das nach Beginn der Translation nicht abgetrennt wurde. Dadurch trägt das Protein eine positive Ladung, die sonst durch die N-terminale Aminogruppe verursacht wird, weniger. Als weitere posttranslationalen Modifikation wurde bereits die Bindung des Chromophors an das Apoprotein diskutiert.

2.2.6.1. Chromophornachweis in den Isobanden

Es war also denkbar, daß zumindest eine Isobande auf chromophorloses Apoprotein, das im Gemisch mit Chromoprotein aufgereinigt worden sei könnte, zurückzuführen wäre.

Wenn eine aufgereinigte Phytochromprobe in höherer Konzentration fokussiert wurde, konnte jedoch in getrockneten, ungefärbten UAIEF-Gelen bei den Isobanden 1,2,3,4 eine grünliche Färbung beobachtet werden, die nur auf den gebundenen Chromophor zu beziehen war. Auch bei Anwendung der Nachweismethode für Biliproteine von Berkelman und Lagarias (1986) konnte der Chromophor in diesen Isobanden durch Fluoreszenz nach Bildung eines Zink-Komplexes detektiert werden.

2.2.6.2. Enzyminkubation und weitere Untersuchungen

Vorstellbar sind auch weitere Veränderungen, die über einen Einfluß auf die Gesamtladung des Proteins den IEP des Proteins verschieben und somit als Ursache für die Heterogenität in Frage kommen.

Hunt und Pratt (1980) bestimmten für 114/118 kD Phytochrom einen Gehalt von kovalent gebundenem Phosphat von 1 Mol pro Monomer. Wong et al. (1986) konnten Phytochrom mit unterschiedlichen Proteinkinasen phosphorylieren.

Um nun zu überprüfen, ob gebundene Phosphatgruppen für die Heterogenität verantwortlich sind, wurde Phytochrom mit den Enzymen Alkalische Phosphatase und Phosphodiesterase (Phospholipase D) inkubiert. Nach Analyse über UAIEF zeigte sich jedoch keine Änderung des Bandenmusters gegenüber unbehandelten Kontrollen. Das deutet darauf hin, daß Phosphatgruppen quantitativ nur sehr gering vorhanden sind, oder aber den Enzymen nicht zugänglich sind. Weiterhin wurde Phytochrom auch mit dem Enzym Neuraminidase, das Neuraminsäure hydrolytisch abspaltet, inkubiert. Hier konnte ebenfalls kein Einfluß auf das Bandenmuster festgestellt werden.

Auch konnten über eine gaschromatographische Analyse (durchgeführt von G. Henkelmann) keine an das Phytochromprotein gebundene Fettsäure nachgewiesen werden. Ein Test auf Aminosucker (Grimm, Dis-

sertationsarbeit 1987) verlief ebenfalls negativ. Es bleibt die Möglichkeit, daß Saccharide O-glykosidisch gebunden sind. Roux et al. (1975) berichteten, daß 114/118 kD Phytochrom Kohlehydrate enthält. Dies konnte in späteren, ähnlichen Versuchen nicht mehr nachvollzogen werden (Pratt, 1982) und es wird angenommen, daß, falls Phytochrom sich als Glycoprotein erweisen sollte, der Kohlehydratgehalt nur wenige Prozent betragen kann.

2.2.7. Fokussierung von Apoprotein-haltigen Extrakten

Kernpunkt dieser Versuche waren die Fragen, ob sich die Isoformen des Holoproteins vom chromophorfreen Apoprotein in ihrem IEP derart unterscheiden, daß sie in abweichenden Banden fokussieren. Ursache für einen abweichenden IEP des Apoproteins könnten die Carboxylgruppen der Propionsäureseitenketten des Chromophors sein. Dagegen sollte eine abweichende Tertiär- bzw. Quartärstruktur, worauf ja die V-8 Proteaseversuche (siehe 1.2.2.) schließen lassen, wegen der Entfaltung der Proteine in 8M Harnstoff keinen Einfluß haben.

2.2.7.1. Fokussierung von Extrakten aus Gabaculin- inkubierten Keimlingen

Wie unter 1.2.1 bereits aufgeführt wurde, ist es durch Inkubation von Haferkeimlingen mit GABA möglich, chromophorfrees Phytochrom-Apoprotein gegenüber dem Holoprotein anzureichern. Durch die Immunoblotanalyse war es nun auch möglich, über die Fokussierung von Rohextrakten aus behandelten und unbehandelten Keimlingen das Phytochrombandenmuster zu vergleichen.

In Abbildung 15 wurden bei Spur 1 und 2 zwei zu vergleichende Extrakte aufgetragen. Das Verhältnis von Apo- zu Chromoprotein betrug bei dem GABA-Präparat 7:1, dennoch ist kein Unterschied im Bandenmuster gegenüber der unbehandelten Kontrolle zu sehen. Abbildung 21 zeigt noch einmal einen Immunoblot mit Extrakten hoher Proteinkonzentration, die direkt vergleichbar sind, die

Keimlinge also zum selben Zeitpunkt ausgesät und geerntet und aufgearbeitet wurden.

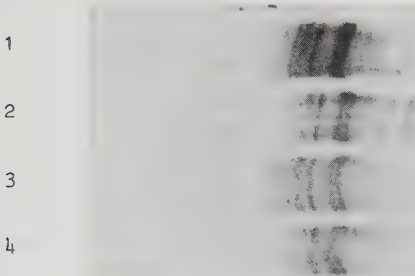


Abb. 21:UAIEF-Immunoblot von Extrakten aus GABA inkubierten und unbehandelten Keimlingen in 8M Harnstoff, Servalyt 5-7 80%, 3-10 20%, in einer Endkonzentration von 2.5 %, 1.3 mM DTT, Trennstrecke 9 cm;

Aufgetragen wurden Rohextrakte von GABA inkubierten und unbehandelten Keimlingen, in 8 M Harnstoff, 1.3 mM DTT aufgenommen. Phytochromspezifische Banden wurden nach Kapillarblot mit den monoklonalen Antikörper Z3B1 und CC5 (Schwarz und Schneider, 1987) detektiert und angefärbt.

1,3 = Extrakt aus GABA inkubierten Keimlingen

2,4 = Extrakt aus unbehandelten Keimlingen

Das Verhältnis von Apo- zu Chromoprotein betrug bei dieser Präparation 7:1. Für die Fokussierung wurden pro Spur jeweils 1200 μ PE, auf den Gesamtphytochromgehalt bezogen, aufgetragen. Daraus ergibt sich, daß das Bandenmuster aus dem GABA-Extrakt durch 1050 μ PE Apoprotein und 150 μ PE Chromoprotein verursacht wird. Bei der Kontrolle sollte nach den spektroskopischen und immunologischen Bestimmungen dagegen vorherrschend Chromoprotein vorhanden sein. Wie in Abb. 15 bei den entsprechenden Proben mit geringerer Proteinkonzentration ist auch hier im Bandenmuster zwischen beiden Extrakten kein wesentlicher Unterschied feststellbar. Zur Auftrennung selbst sei noch angemerkt, daß die Ausbildung des pH-Gradienten sich an die Verhältnisse bei Abb.9 anlehnt, die Bande 2b mit dem saureren pI des Bandenpaares 2 schließt sich der

Hauptbande Nummer 3a näher an, weshalb sich innerhalb der Doppelbande 2a,b eine Lücke bildet. Beim Vergleich der beiden Spuren fällt weiter auf, daß auch beim GABA-Extrakt Nebenbanden im sauren Bereich auftreten, die in ihrer Lage mit den entsprechenden der Kontrolle übereinstimmen. Das deutet darauf hin, daß es sich bei ihnen um reelle Isoformen und nicht nur um nicht vollständig denaturierte Abkömmlinge der Hauptbanden handelt, wie sie insbesondere bei der Entfaltung von Pr auftreten können (siehe 2.2.1.). Beim Apoprotein sollte dieser stabilisierende Einfluß des Chromophors in der Pr-Form gegen denaturierende Agentien jedoch nicht auftreten. Wäre es selbst ähnlich widerstandsfähig gegenüber der entfaltenden Wirkung von 8M Harnstoff wie Holoprotein in der Pr-Form, sollte auch sein Bandenmuster, unbeeinflußbar von HR- oder WL-Belichtungen gleichermaßen ausfallen. Allerdings könnten die Banden im sauren Bereich teilweise auch durch Abbaupeptide verursacht sein. Daß unterschiedliche Konformationen des Chromophors, wie sie bei freien Bilin-Pigmenten möglich sind (Rüdiger, 1983) die Heterogenität begründen, kann ausgeschlossen werden. Denn dann dürften bei der GABA-Probe außer der dann zu erwartenden Apoprotein-Hauptbande nur schwache, durch den geringen Chromoprotein-Anteil verursachte Nebenbanden auftreten.

2.2.7.2. Fokussierung des über in vitro Translation und Immunpräzipitation gewonnenen Apoproteins

Über in vitro Translation im zellfreien Ansatz in Retikulozytenlysat oder Weizenkeimsystem läßt sich durch Immunpräzipitation aus dem Gemisch der verschiedenen Translationsprodukte das Phytochromapoprotein aufreinigen. Gottmann und Schäfer (1982) wandten diese Methode an und konnten erstmals ein höheres Molekulargewicht des Apoproteins gegenüber dem damals üblichen 114/118 kD aufgereinigten Phytochrom-Chromoprotein nachweisen. Colbert, Hershey und Quail (1983) wiesen über in vitro Translationsversuche nach, daß Phytochrom eine autoregulatorische Kontrolle über seine eigene translatierbare mRNA ausübt. Ziel meiner Versuche war es, Phytochromapoprotein über diese Methode zu erhalten und sein Bandenmuster in der UAIEF zu analysieren.

Dazu wurde aus Keimlingen, sowie Koleoptilen die Gesamt-RNA (tot-RNA) isoliert und daraus die Poly A mRNA über Oligo-dT-Zellulose-Chromatographie aufkonzentriert. Abbildung 22 zeigt ein Autoradiogramm, bei dem Gesamttranslationsprodukte verschiedener mRNA-Präparationen über SDS-PAGE aufgetrennt wurden.

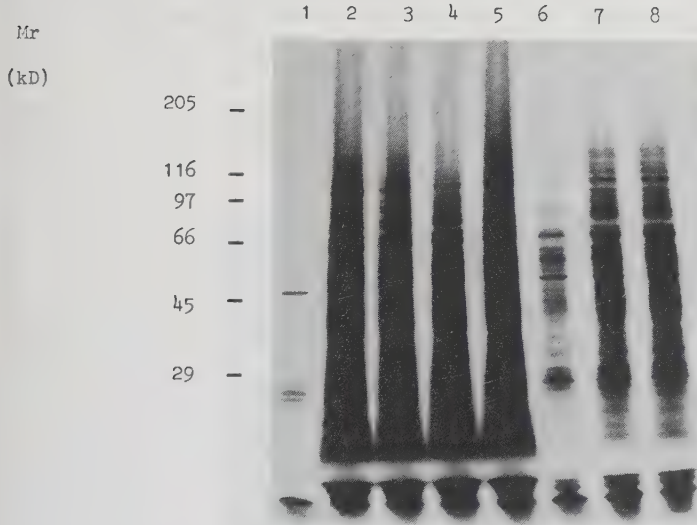


Abb. 22: SDS-PAGE-Autoradiogramm von Gesamttranslationsprodukten verschiedener mRNA-Präparationen; Es wurden jeweils gleiche Volumina (3 µl) aus Standardansätzen auf ein 7.5 - 15% PAGE-Gel aufgetragen.

1 = 0-Probe, ohne extern zugegebene mRNA;
2 = tot-RNA, aus Keimlingen, 2 µg im Standardansatz eingesetzt;
3, 4, 5 = 3 Poly A RNA's verschiedener Präparationen, je 0.75 µg;
6, 7, 8 = tot-RNA aus Koleoptilen, 0.8, 1.6, 2.4 µg eingesetzt;
Links sind die Molekulargewichte der Standardmarker angegeben.

Die Schwärzung der Spuren gibt auch den Einbau an ^{35}S -Methionin in die translatierten Proteine gegenüber der 0-Probe wieder. Er war bei Kammer 2: 23%, 3: 19%, 4: 19%, 5: 30%, 6: 4.6%, 7: 8.6%, 8: 9.2% mal so hoch wie bei der 0-Probe. Deutlich ist auch erkennbar, daß das Molekulargewicht der synthetisierten Proteine über 150 kD hinausgeht, also kein vorzeitiger mRNA-Kettenabbruch erfolgt ist. Die total-RNA aus ganzen Keimlingen weist verglichen mit jener aus Koleoptilen eine höhere Einbaurate auf, dafür ist das Verhältnis

an Peptiden mit höherem gegenüber niedrigerem Molekulargewicht bei den Koleoptilen größer.

Aus derartigen Ansätzen wurde nun mit monoklonalen Antikörpern (z.B. FD4 und Z6D5) versucht, spezifisch das Phytochromapoprotein zu präzipitieren und diesen Antikörperkomplex über Sepharose Protein A zu binden. Da translatierbare Phytochrom-mRNA nur $\approx 0.005\%$ der Gesamt-Poly(A)-mRNA in etioliierten Haferkeimlingen bildet (Colbert et al., 1983), konnte nicht mit großen Ausbeuten an Apoprotein gerechnet werden.

Abb. 23 zeigt ein Autoradiogramm, bei dem Immunpräzipitate über SDS-PAGE aufgetrennt wurden.

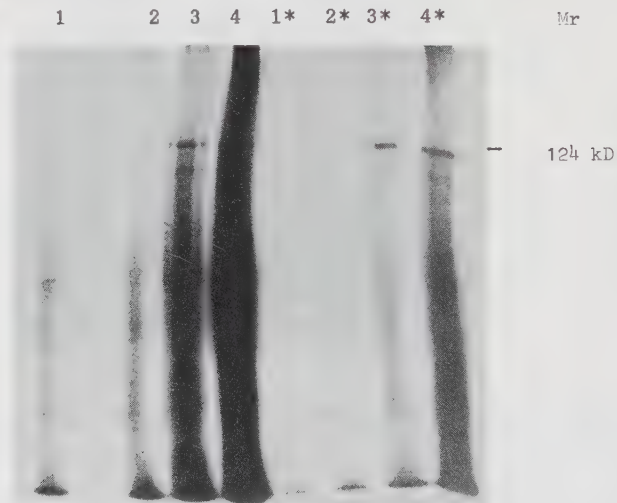


Abb.23: SDS-PAGE Autoradiogramm von Immunpräzipitaten aus Translationsansätzen mit Poly A-RNA aus ganzen Keimlingen und tot-RNA aus Koleptilen (linearer Gradient 7.5 - 15%); Pro Spur wurde ein Aliquot des Immunpräzipitats zweier Standardansätze aufgetragen.

Spur 1* und 2*: Immunpräzipitat aus Translationsansätzen mit tot-Koleptilen RNA; 1* wurde dabei zusätzlich mit *S. aureus* Zellen vorbehandelt. Beide Proben wurden mit 8.9 M Harnstoff, 2.6 mM DTT, 1% Triton X-100 von Sepharose Protein A eluiert.

Spur 3* und 4*: Immunpräzipitat aus Translationsansätzen mit Poly A-RNA; 4* wurde zusätzlich mit *S. aureus* behandelt. Beide Proben wurden mit 8.9 M Harnstoff, 2.6 mM DTT, 1% Triton X-100 von Sepharose Protein A eluiert.

Spur 1,2,3,4: Parallelproben zu 1*,2*,3*,4*, nach der Harnstoff-elution mit Elektrophoreseprobenpuffer von Sepharose Protein A eluiert;

Es wurden jeweils die Immunpräzipitate aus 2 identischen Standardansätzen mit Gesamt-RNA aus Koeptilen (2,4µg pro Ansatz), sowie mit Poly A RNA aus ganzen Keimlingen (0.75µg pro Ansatz) aufgetragen. Zusätzlich zur Sepharose-Protein A-Chromatographie waren die Proben 1* und 3* vor der Zugabe der monoklonalen Antikörper mit *Staphylococcus aureus* Zellen (Protein A an den Zellwänden) behandelt worden, um unspezifische Bindung von in vitro Translationsprodukten an Protein A bei der Sepharose-Protein A-Chromatographie zu reduzieren. Abgelöst wurde in 3 Stufen: Zunächst nur mit 8.9 M Harnstofflösung, 2.6 mM DTT, gefolgt von 8.9 M Harnstofflösung, 2.6 mM DTT und 1% Triton X-100, zuletzt mit Elektrophoreseprobenpuffer (SDS-haltig).

Aus dem Vergleich der beiden unterschiedlichen Eluate wird deutlich, daß mit Harnstofflösung auch bei Zugabe von Triton (neutrales Detergenz) keine quantitative Ablösung des Immunkomplexes von der Säulenmatrix zu erreichen ist. Eine anschließende Elution mit Probenpuffer setzt noch Apoprotein frei (Spur 1 mit 4).

Zur *S. aureus*-Behandlung kann angemerkt werden, daß bei den Poly A Translationsansätzen eine Reduzierung der unspezifischen Proteinbindung erzielt werden konnte. Dagegen scheint diese Methode für die Gesamt-RNA aus Koeptilen nicht sehr von Vorteil zu sein. Allgemein ist festzustellen, daß trotz der deutlichen 124 kD-Bande des Apoproteins noch unspezifische Proteinbanden auftreten. Dabei ist jedoch zu bedenken, daß auf das SDS-PAGE-Gel des Autoradiogramms von Abb. 23 die 2. Ablöseportion der Sepharose-Protein A-Chromatographie aufgetragen wurde, der 1. Teil (ohne Triton) war erfahrungsgemäß sauberer, wie in dem UAIEF-Autoradiogramm noch zu sehen sein wird.

Abb. 24 zeigt das Autoradiogramm dieses UAIEF-Gels.

A

1

2

3

4

1*

2*

3*

4*

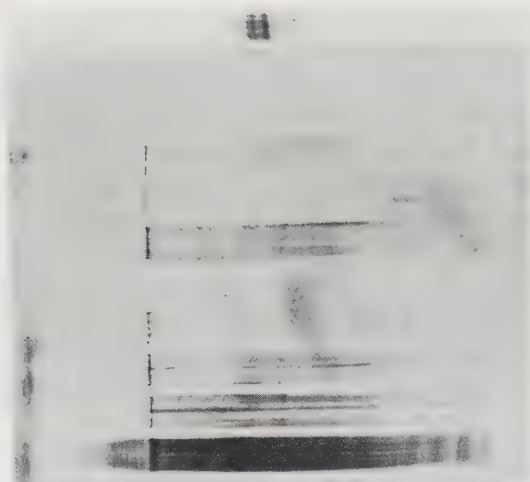


Abb.24:UAIEF-Gel Autoradiogramm von Immunpräzipitaten aus Translationsansätzen mit Poly A-RNA aus ganzen Keimlingen und Gesamt-RNA aus Koleoptilen.

Das UAIEF-Gel war ohne Harnstoffzugabe gegossen worden, war anschließend getrocknet und wieder in Harnstoff-Ampholinelösung gequollen worden, Servalyt 5-7 80%, 3-10 20%, 8M Harnstoff, Trennstrecke 10 cm, $U_{\max}=2.8$ kV, 7200 V·h;

A: Pfr in 8.9 M Harnstoff, 2.6 mM DTT, 1% Triton, SAR=0.91;

1*,2*,3*,4*: analog zu Abb. 23 (2.Eluat);

1,2,3,4: 1. Eluat der Sepharose-Protein A-Chromatographie mit 8.9 M Harnstoff, 2.6 mM DTT (ohne Triton);

Bei den Spuren 1,2,3,4 wurde das doppelte Volumen 1. Eluat (20 μ l) aufgetragen, bei 1*,2*,3*,4* mit 12 μ l 2. Eluat genausoviel wie bei den entsprechenden SDS-PAGE-Spuren in Abb.23. Um Präzipitationen am Auftragsort zu verhindern, wurde zusätzlich pro Kammer 2 μ l denaturiertes Phytochrom in Harnstofflösung zugegeben. Bei Spur A wurde reines Phytochrom als Kontrolle aufgetragen und Coomassiegefärbt. Sehr gut ist hier das bekannte Bandenmuster zu sehen.

Vergleicht man das Bandenmuster der Proben des 1. und des 2. Eluats (ohne und mit Triton), wird deutlich, daß das zuerst abgelöste Immunpräzipitat (ohne Triton) weniger unspezifische Verunreinigungen aufweist, obwohl das doppelte Volumen aufgetragen wurde. Dies läßt sich besonders am Auftreten von Banden links vom Auftragspunkt sowie an der Zunahme von Banden im sauren Bereich bei den 2.Eluaten zu sehen. Dennoch ist eine verwirrende Vielzahl

von, wenn auch schwachen Banden zu sehen, die wie in der SDS-PAGE von unspezifisch gebundenen Translationsprodukten verursacht werden. Wendet man ähnliche Kriterien zur Identifizierung der Lage des Apoproteinäquivalents an wie bei der SDS-PAGE, deutliche Proteinbande, Lage beim entsprechenden Molekulargewicht, also in diesem Fall im entsprechenden pH-Bereich des Phytochrompolypeptids, fallen durchgehend bei allen Spuren 2 Banden besonders auf, die identische IEP's mit den Chromoproteinisoformen 3a,b aufweisen. Daneben tritt an den entsprechenden Positionen der Isoformenpaare 1 und 2 keine derartig prägnante Schwärzung auf. Vergleicht man das Bandenmuster des Immunpräzipitats mit dem eines Immunoblots aus Rohextrakten (z.B. Abb. 14 und 15) wird dieser Sachverhalt offensichtlich. Beim Immunoblot weisen die Isoformenpaare 1 und 2 relativ die gleiche Intensität wie Paar 3 auf, das im Autoradiogramm dagegen dominiert. Versuche, dieses Bandenmuster über eine SDS-PAGE in der 2. Dimension über das Molekulargewicht aufzuschlüsseln, schlugen fehl. Auf den entsprechenden Autoradiogrammen konnten keine eindeutigen Banden detektiert werden. Dies kann sowohl auf mangelhafte Ablösung des Immunpräzipitats von Sepharose-Protein A mit Harnstoff (SDS-haltige Puffer stören bei der Fokussierung) wie auch auf schlechtes Eindringen des translatierten Apoproteins aus dem UAIEF-Gel in die 2. Dimension (SDS-PAGE) zurückgeführt werden. Dennoch bleibt festzuhalten, daß mindestens 2 Banden im fraglichen pH-Bereich deutlich hervortraten, was für verschiedene Genprodukte mit unterschiedlichen pI's spricht.

Für eine entschiedenere Antwort auf die gestellte Frage, das Bandenmuster des in vitro synthetisierten Apoproteins zu bestimmen, wäre eine noch spezifischere Immunpräzipitation und damit eine höhere Reinheit des phytochromentsprechenden Translationsprodukts nötig. Dies zu erreichen, dürfte jedoch auf Grund des geringen Anteils der mRNA von Phytochrom an der Gesamt-Poly A-RNA nicht leicht zu verwirklichen sein.

2.3. Abschließende Diskussion

2.3.1. Unterschied Chromoprotein - Apoprotein

Wie bereits im Namen offensichtlich wird, zeichnet sich das Chromoprotein gegenüber dem Apoprotein durch den Besitz eines kovalent gebundenen Chromophors, des Phytochromobilins, aus. Dagegen waren weitere Modifikationen und Unterschiede zwischen beiden Proteinen bisher nicht bekannt. Nach den Ergebnissen aus den V-8 Abbauprobeversuchen mit Extrakten GABA-inkubierter Keimlinge (1.2.1.) dürften Abweichungen in der Tertiärstruktur- bzw. Quartärstruktur des Phytochrom-Apoeins gegenüber der Pr- sowie der Pfr-Form des Holo-proteins vorliegen. Theoretisch ist auch ein differenter IEP der entfalteten Proteine zu erwarten, der durch die Carboxylgruppen der Propionsäureseitenketten des Chromophors (bei Dissoziation zusätzliche negative Ladung des Holo- gegenüber dem Apoprotein) hervorgerufen wird. Im nativen Zustand der Proteine könnte ein solcher Unterschied auch auf Grund anderer Oberflächenladungen, die durch die abweichende räumliche Faltung denkbar sind, bedingt sein. Dieser Effekt sollte bei vollständig entfaltenen Proteinen keinen Einfluß mehr haben.

Hier bestimmen Verteilung, pKa und Polarität sämtlicher geladener Gruppen den IEP des Proteins, bei bekannter Sequenz der Aminosäuren ist er auch zu berechnen.

Wie könnte man nun das gleiche Fokussiermuster von Apo- und Chromoprotein erklären? Auch die immunpräzipitierten in vitro-Translationsprodukte zeigten ja keine Bandenabweichung.

Zunächst wird für Phytochrom eine 2. kovalente Bindung mit der Polypeptidkette für möglich gehalten (Rüdiger, 1980, Lagarias und Rapoport, 1980), die über die Propionsäureseitenkette des Rings C verlaufen soll. Damit wäre eine der beiden Carboxylgruppen des Chromophors blockiert, und der Unterschied zwischen Apo- und Chromoprotein ist nur noch durch eine negative Ladung verursacht. Der pKa von Propionsäure allein beträgt 4.8, in Verbindung mit der Bilingruppe liegt er zwischen 4.4 und 4.45 (Schropp, 1986), da er noch vom Pyrroleninstickstoff beeinflußt wird. Beim IEP des Phytochroms von pH 5.9 dürfte eine Dissoziation dieser Carboxylgruppe

vorliegen. Inwieweit wird nun dadurch der pI dieses doch relativ großen Proteinmoleküls beeinflusst? Sharrock et al. (1986) haben die Aminosäuresequenz von Zucchini-Phytochrom über die Nukleotidsequenz eines cDNA-Klons abgeleitet. Das Molekulargewicht beträgt 124.95 kD und entspricht damit dem von Haferphytochrom, obwohl die Polypeptidkette um 5 Aminosäuren kürzer ist als beim Hafer (1125 Aminosäuren gegenüber 1128, dabei ist der Initiator Methionin nicht mitgezählt). Die Homologie gegenüber den Haferphytochromen Typ 3 und 4 beträgt 65%. Der pI wurde über ein Computerprogramm berechnet, liegt bei 6.2 und damit um 0.3 pH-Einheiten höher als der auf gleicher Weise ermittelte von Haferphytochrom. Der Unterschied läßt sich darauf zurückführen, daß Zucciniphytochrom 1 Arg und 1 Lys mehr aufweist, dafür aber 5 Asp, 3 Glu und 5 His - Aminosäuren weniger besitzt als Haferphytochrom Typ 3. Der pK_a der Imidazolgruppe von His beträgt 6, deshalb kann nach dem Massenwirkungsgesetz angenommen werden, daß His in entsprechendem pH-Bereich der pI-Werte 6.2 - 5.9 nur zur Hälfte protoniert und damit positiv geladen vorliegt.

Bei den anderen Aminosäuren kann angenommen werden, daß sie auf Grund ihrer höheren oder niedrigeren pK-Werte alle entweder positiv (Arg, Lys) oder negativ (Glu, Asp) geladen sind. Berücksichtigt man diese Überlegungen, müßte der Unterschied von 0.3 pH-Einheiten zwischen den beiden unterschiedlichen isoelektrischen Punkten der Phytochromproteine auf einer Differenz von 7.5 Ladungen beruhen. Daraus läßt sich ableiten, daß eine Ladung eine pI-Differenz von 0.04 verursacht, und auch, wenn man den Einfluß von protonierten His außer Acht läßt, ist dieser Wert noch auf 0.03 zu bestimmen. Dieser Unterschied dürfte gerade an der Auflösungsgrenze des verwendeten UAIEF-Systems liegen. Trägt man etwa den gemessenen pH-Gradienten gegen die Trennstrecke in Abbildung 9 auf und ermittelt über diese Standardkurve die pH-Differenz von den zwei direkt nebeneinanderliegenden Isobanden 3a und b, ergibt sich ein Wert von 0.02 - 0.03. Dies entspricht sehr genau den von Stromska (1982) ermittelten Daten, der Ladungsunterschiede von 0.02 - 0.04 pH-Einheiten auflösen konnte, als er die Heterogenität von Tubulin-Untereinheiten mittels UAIEF untersuchte. Damit wollen wir wieder auf die eingangs gestellte Frage zurückkommen, inwieweit der Chromophor den pI des Phytochrom-Apoproteins beeinflusst. Nach

der oben getroffenen Feststellung sollte der IEP durch zwei negative Ladungen um 0.06 - 0.08 pH-Einheiten verschoben werden, und dies sollte im UAIEF-System durchaus zu erkennen sein, während eine negative Ladung knapp an der Auflösungsgrenze liegen dürfte. Da zwischen dem Fokussiermuster von GABA-inkubierten und Kontroll-Extrakten nun kein Unterschied zu erkennen war, sollte am IEP des Chromoproteins zumindest keine gleichzeitige Dissoziation beider Propionsäure-Carboxylgruppen vorliegen. Das ist ein Hinweis darauf, daß tatsächlich eine 2. konvalente Bindung zwischen Chromophor und Apoprotein vorliegt. Dadurch wäre eine der beiden negativen Ladungen der Propionsäureseitenketten nicht existent. Daß es mit dem verwendeten UAIEF-System auch durchaus möglich ist, einen einfachen Ladungsunterschied zu erkennen, sei am Beispiel des pI-Markers β -Lactoglobulin demonstriert. Dieses Protein besteht aus 162 Aminosäuren und kommt in zwei genetischen Varianten A und B vor, die sich durch zwei Aminosäureaustausche voneinander unterscheiden, Asp gegen Gly sowie Val gegen Ala (Creighton, 1979). Typ A weist demnach eine negative Ladung mehr auf als Typ B, was den IEP der Variante von 5.34 auf 5.2 erniedrigt (Malamud und Drysdale, 1978; Pharmacia und Serva, pI-Markerproteinbeschreibung). Dabei ist in den Pharmacia Markerproteinen nur Typ A vertreten, während bei Serva beide Isoformen nebeneinander vorliegen. In den Abbildungen 7, 8 und 9 sind beide Banden jeweils getrennt sichtbar. Es bleibt noch hinzuzufügen, daß es sich bei β -Lactoglobulin um ein relativ kleines Protein handelt, weshalb ein Ladungsunterschied schon eine pI-Verschiebung von 0.14 verursachen kann. Andererseits liegen die β -Lactoglobulin-Banden nicht im Bereich der optimalen Spreizung des pH-Gradienten, was begründen könnte, weshalb die einzelnen Phytochromisoformen trotz geringerer pI-Unterschiede einen vergleichbaren oder sogar größeren Abstand voneinander haben. Anderson und Hickman (1979) berichteten, daß bei vielen großen Polypeptiden pI-Verschiebungen durch einen einfachen Ladungsunterschied in der Größenordnung von 0.01 pH-Einheiten liegen. Nach den hier angestellten Vergleichen und Überlegungen scheint dieser Effekt bei Phytochrom jedoch größer zu sein. Einschränkend dazu muß jedoch angemerkt werden, daß der IEP von Zucchini-Phytochrom experimentell bisher noch nicht eindeutig festgestellt wurde. Cordonnier und Pratt (1982a) bestimmten für

durch Immunpräzipitation aufgereinigtes Zucchini-Phytochrom einen pI-Bereich von 6.5 - 7.0, ohne jedoch mögliche Proteolyse in der Pr-Form nach der Extraktion zu beachten (Vierstra und Quail, 1985), was die Abweichung gegenüber dem über die Aminosäuresequenz berechneten pI von 6.2 erklären dürfte.

2.3.2. Unterschied Pr - Pfr

Beim Pr-Pfr Fokussierungsunterschied in Harnstoff-Agarosegelen wird dokumentiert, daß der IEP im nativen oder teilentfalteten Zustand geringfügig weiter im sauren liegt, und daß Phytochrom in der Pr-Form dem Prozeß der Entfaltung einen größeren Widerstand entgegensetzt als Pfr. Dieser Sachverhalt spricht für stärkere Interaktionen innerhalb des Proteins beim Pr, könnte aber auch auf eine innere Spannung der Polypeptidkette in der Pfr-Form hinweisen, die durch die Photokonversion des Chromophors verursacht wurde und durch chaotrope Reagentien wie Harnstoff leicht gelöst wird. Denkbar ist auch, daß der Zugang denaturierender Substanzen in das hydrophobe Innere des Proteins in der Pr-Form erschwert ist. Betrachtet man das Entfaltungsmuster der Phytochrombanden, ist auch in Erwägung zu ziehen, daß die einzelnen Isoformen in der Pr-Form eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber der denaturierenden Wirkung von Harnstoff aufweisen. Bandenpaar 1 scheint demnach relativ stabil zu sein, da es vor der Konversion zu Pfr kaum in Erscheinung tritt und wohl noch in teildenaturiertem Zustand unter den im sauren liegenden Banden zu suchen ist. Bandenpaar 3 dagegen müßte, nach dem Verteilungsmuster beurteilt, diejenige Form darstellen, die auch in der Pr-Form durch 8M Harnstoff vollständig entfaltet wird, da es bereits seine spezifische Position einnimmt und keine Änderung in der Intensität und damit der Proteinmenge der Bande nach Belichtung zu Pfr auftritt. Der Unterschied zwischen den IEP's der einzelnen Hauptbandenpaare beträgt unter denaturierenden Bedingungen im Mittel 0.03 - 0.04 pH Einheiten (gemessen etwa zwischen 1a und 1b). Nach den im vorigen Punkt angestellten Überlegungen dürfte dies einem ein bis zweifachen Ladungsunterschied entsprechen. Zwischen den Banden 1a und 3a, bei einer pH-Spanne von 0.14, ist dann mit einer La-

dungsdifferenz von 4 Einheiten zu rechnen. Allerdings sind diese Überlegungen nur für das denaturierte Protein zutreffend. Im nativen Zustand ist gerade bei dem doch relativ großen Phytochromprotein nicht wahrscheinlich, daß wie im entfalteten Zustand alle geladenen Gruppen an der Oberfläche lokalisiert sind und somit dissoziiert vorliegen. Unter diesem Gesichtspunkt ist die deutlichere Aufspaltung der einzelnen Phytochromisoformen in denaturierenden IEF-Gelen zu sehen, die somit auf Ladungsunterschieden beruhen dürfte, die erst nach der Auffaltung der Polypeptidkette manifest werden. Bei kleineren Proteinen dagegen wird allgemein angenommen, daß die hydrophoben Seitengruppen nach innen, die polaren Reste nach außen gewandt sind, und somit alle Ladungen zum Tragen kommen. In der Agarose-IEF ohne Harnstoff beträgt der Unterschied der isoelektrischen Punkte von Pr und Pfr 0.05 - 0.1 pH Einheiten. Geht man davon aus, daß auch im nativen Protein sämtliche Ladungen an der Oberfläche liegen (wie im denaturierten Zustand), entspräche der gemessenen pH-Differenz eine Ladungsabweichung von 2-3 Einheiten. Berücksichtigt man jedoch, daß in diesem großen Molekül nur ein Teil der polaren Gruppen mit dem Außenmedium in Kontakt kommt, und damit also die Gesamtzahl an titrierbaren, geladenen Gruppen abnimmt (Phytochrom Typ 3: 53 Arg, 64 Lys, 68 Asp, 77 Glu, 34 His), vergrößert sich der Einfluß eines einfachen Ladungsunterschieds auf den IEP des Proteins. Deshalb ist es auch durchaus möglich, daß bereits ein einfacher Ladungsunterschied für das differente Pr-Pfr Muster in nicht denaturierenden IEF-Gelen verantwortlich ist. Daß die Photokonversion von Phytochrom auch Änderungen in der Tertiärstruktur des Proteins zur Folge hat, ist durch viele Untersuchungen bestätigt worden (zusammengefaßt bei Vierstra und Quail, 1986), eine Änderung des IEP ist allerdings bisher noch nicht beschrieben worden. Hunt und Pratt (1981) fanden bei der Fokussierung von immunoaffinitätsgereinigtem 118/114 kD Phytochrom keinen Unterschied zwischen Pr und Pfr. Dies könne bedeuten, daß die Änderung der Oberflächenladung bei nativem 124 kD Phytochrom nach der Photokonversion zu Pfr gerade jene Regionen betrifft, die beim 118/114 kD Phytochrom fehlen, da sie proteolytisch abgespalten wurden. Dabei dürfte es sich um N-terminale Fragmente handeln, wie aus den Untersuchungen von Jones et al. (1985) und Grimm (1987) hervorgeht, der die maximale Länge dieses Bruchstücks durch

Mikrosequenzierung auf 6.6 kD angibt. Wie auch aus anderen Berichten (Cordonnier et al., 1985, Lagarias und Mercurio, 1985) ersichtlich ist, sollte dieses Fragment in der Tertiärstruktur der Pr-Form stärker exponiert sein als in der Pfr-Form. Es wird auch für CD-Spektralunterschiede verantwortlich gemacht (Vierstra et al., 1987, Chai et al., 1987b). Diese Daten weisen darauf hin, daß jenem Bruchstück eine besondere Bedeutung bei der Photokonversion von Phytochrom zuzuordnen ist.

2.3.3. Ursachen der Heterogenität

Für eine Mikroheterogenität von Proteinen bei der IEF können mehrere Ursachen verantwortlich sein:

- a) alternativ-stabile Konformationen; b) oligomere Kombinationen von Untereinheiten; c) posttranslationale Modifikationen (Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Einfügung von Zuckergruppen, und anderes mehr); d) festgebundene Co-Faktoren, Inhibitoren, verschiedene Ladungszustände, Redoxsysteme; e) in vitro Modifikationen (Proteolyse, Carbamylierung, Oxidation und anderes mehr); f) genetischer Polymorphismus;

Nach den hier durchgeführten Untersuchungen können einige dieser Möglichkeiten ausgeschlossen oder eingeschränkt werden. Am wahrscheinlichsten dürften als Ursachen zum einen genetischer Polymorphismus, zum anderen posttranslationale Modifikationen in Frage kommen. Daß verschiedene Phytochromgene transkribiert werden konnten Hershey et al. (1985) zeigen. Den Nachweis, daß die daraus resultierenden mRNA's auch translatiert werden, führte R. Grimm (1987), der über Mikrosequenzierung von durch proteolytischen Abbau gewonnenen, reinen Phytochrompeptiden 2 heterogene Aminosäuresequenzen identifizieren konnte. Hershey et al. (1985) fanden mindestens 4 verschiedene Phytochromgene, bestimmten jedoch nur die vollständige Nukleotid- und darüber die Aminosäuresequenz von 2 Isoformen, Typ 3 und Typ 4. Diese unterscheiden sich danach im Gehalt an geladenen Gruppen, Typ 3 dürfte mit 1 Arg und 1 His weniger als Typ 4 einen etwas mehr im sauren liegenden IEP aufweisen. Nach den in 2.3.1. durchgeführten Überlegungen entspräche dies einem Ladungsunterschied von 1 - 1.5 Einheiten, und die daraus abge-

leitete pH-Abweichung beträgt dann 0.03 - 0.06 Einheiten. Dies entspricht dem Abstand der Banden innerhalb einer Doppelbande und dürfte im Auflösungsbereich des verwendeten UAIEF-Systems liegen. Allerdings legt die relative Frequenz der cDNA-Klone nahe, daß bei der Expression der Gene Unterschiede vorkommen, denn 80% der Klone entsprechen entweder Typ 4 oder 5. Trifft dies auch für die relativen Anteile der Isoproteine in einer aufgereinigten Phytochrompräparation zu, sollte Typ 3 also nur eine schwächere Bande zuzuordnen sein. Über Ladungsunterschiede zwischen Typ 4, Typ 5 und dem 4. Genprodukt ist nichts bekannt, da dafür die vollständigen Sequenzen verfügbar sein müßten. Eine Differenz von 2 und mehr Ladungseinheiten entspräche der pH-Spanne zwischen den einzelnen Hauptbanden. Allerdings ist der Unterschied zwischen den Banden 1a und 3a, oder sogar zu 4 schon sehr hoch (0.14 b.z.w. 0.2 pH-Einheiten), weshalb auch andere Ursachen neben dem genetischen Polymorphismus zur Erklärung der Isobanden diskutiert werden müssen. Auch ist die Gesamtzahl der Isoformen nicht mit der relativen Frequenz der cDNA-Klone (Typ 4 und 5 = 80%) in Einklang zu bringen, da dann nur 2 Hauptbanden auftreten sollten. Hier bietet sich als Erklärung eine zusätzliche posttranslationale Modifikation der Proteine an, die die Ladungsunterschiede vergrößern und ausweiten könnte. Nach den Forschungsergebnissen mit Extrakten GABA-inkubierter Keimlinge müßten derartige Veränderungen bereits das Apoprotein erfassen, wohingegen der angefügte Chromophor keinen erkennbaren Einfluß auf das Isobandenmuster zeigt. Gerade diese eigentlich unerwartete Tatsache (siehe 2.3.1.) erschwert das Verständnis und die Aufklärung der Ursachen der Heterogenität doch sehr und wirft mehr neue Probleme auf, als alte Fragen zu lösen. Nachdem offenbar auch keine Organspezifität der Isoformen vorliegt, wäre noch an eine intrazellulär-differente Verteilung zu denken. Dennoch bietet sich mit der Existenz verschiedener Phytochrom-Isoformen eine plausible Antwort für die Erklärung der unterschiedlichsten, phytochromgesteuerten Reaktionen und photomorphogenetischen Wirkungen an, die eben durch differente Proteine hervorgerufen werden könnten.

III. Zusammenfassung

1) Es wurde eine Methode entwickelt, den Phytochromchromophor in etiolierten Haferkeimlingen mit radioaktiven Vorstufen zu markieren. Dabei erwies es sich am günstigsten, die Markersubstanz am 2. Tag der Keimung direkt auf den Pflanzenembryo zu tropfen.

2) Sowohl der Einbau von ^{14}C - δ -Aminolävulinsäure, wie auch von $[1-^{14}\text{C}]$ und $[5-^{14}\text{C}]2$ -Oxoglutarat in das Chromopeptid von Phytochrom konnte detektiert werden. Aus den Ergebnissen mit $[1-^{14}\text{C}]$ und $[5-^{14}\text{C}]2$ -Oxoglutarat ist zu folgern, daß die Biosynthese des Chromophors über die Vorstufe δ -Aminolävulinsäure unter Beteiligung des C-5 Weges und nicht ausschließlich über den Shemin-Weg erfolgt.

3) Es konnte bestätigt werden, daß die Inkubation von etiolierten Haferkeimlingen mit dem Transaminaseinhibitor Gabaculin zu einem spektral meßbaren, reduzierten Chromoproteingehalt führt. Dagegen blieb der über immunologische Methoden zu erfassende Gesamtphytochromgehalt, der auch das chromophorfreie Apoprotein einschließt, nahezu unverändert. Die Bedeutung dieser Ergebnisse für die Biosynthese von Phytochrom-Chromophor und Apoprotein wird diskutiert.

4) Bei einer Verdauung mit V-8 Protease konnten im Abbaupeptidmuster von Extrakten mit hohem Apoproteingehalt Unterschiede gegenüber Kontrollextrakten festgestellt werden.

5) Bei der isoelektrischen Fokussierung von hochaufgereinigten Phytochromproben in nicht denaturierenden Agarosegelen (AIEF) konnten unterschiedliche isoelektrische Punkte für die Pr- und Pfr-Form des Chromoproteins gefunden werden.

6) Auch bei der nativen Gelelektrophorese in Acrylamidgelen bei pH 8.8 konnte ein unterschiedliches Laufverhalten zwischen der Pr- und der Pfr-Form nachgewiesen werden.

7) Bei der isoelektrischen Fokussierung in Agarosegelen mit 8M Harnstoff als denaturierendem Agens (UAIEF) wurden mehrere Isoformen bei der Auftrennung von hochaufgereinigten Phytochromproben gefunden. Zudem war es möglich, auch über diese Methode die unterschiedliche Reaktivität von Phytochrom in der Pr- und der Pfr-Form gegenüber der Denaturierung durch Harnstoff zu bestätigen.

8) Über Immunoblotanalyse konnten auch bei der Fokussierung von schwach aufgereinigten Extrakten mit hohem Fremdproteingehalt Phytochrom-Isoformen spezifisch sichtbar gemacht werden. Bei Anwendung dieser Methode war im Bandenmuster von Extrakten aus 2 Hafer-sorten sowie unterschiedlichen Keimlingsorganen (Koleoptile, Primärblatt, Wurzelspitze) keine Variabilität zu finden.

9) Auch beim Vergleich von apoproteinhaltigen Extrakten, die zum einen über Gabaculin-Behandlung, zum anderen über in vitro Translation und Immunpräzipitation erhalten wurden, konnten keine Unterschiede im UAIEF-Bandenmuster nachgewiesen werden.

10) Weitere Untersuchungen über die Entstehung der Isobanden von Phytochrom wurden durchgeführt. Im Hinblick auf die Ergebnisse werden mögliche Ursachen für die beobachtete Banden-Heterogenität, wie posttranslationale Modifikationen und genetischer Polymorphismus, diskutiert.

IV. Material und Methoden

1. Geräte

1.1. Photometer, Belichtungseinrichtung

UV-Vis-Spektren wurden mit dem 2-Strahl-Spektralphotometer DMR 22 mit Doppelmonochromator (Firma Zeiss, Oberkochen) aufgenommen. Die Belichtung der Proben erfolgte in den Küvettenräumen des Photometers, das über eine Eigenbau-Belichtungseinrichtung verfügt (Brandlmeier et al., 1981). Hauptbestandteile dieser Apparatur sind eine 12V-Halogenlampe und 2 Interferenzfilter (Firma Searom, Argenteil, Frankreich) mit Wellenlängen von 660.3 nm und 738.3 nm. Am Ort der Küvette ergab sich, gemessen im Bereich des Meßstrahls des Photometers, für den HR-Filter eine Lichtflußrate von 64 W/m², für den DR-Filter von 31 W/m².

1.2. Durchflußphotometer, Fraktionssammler

Die Transmission von Säuleneluaten wurde mit einem Durchflußphotometer Uvicord II der Fa. LKB (Schweden) bei 280 nm gemessen und mit einem Schreiber Typ WS 1 der Fa. Colora (Lorch) registriert. Eluate wurden mit Fraktionssammlern Typ Mini Escargot der Fa. Gilson (Frankreich) gesammelt.

1.3. Zentrifugen

Niederschläge wurden mit den Kühlzentrifugen G 50 K der Fa. WKF und Centrikon H-401 der Fa. Kontron, Hermle abzentrifugiert. Dabei kamen folgende Rotoren zum Einsatz:

WKF G 50 K:	6 * 500 ml mit 19000 g bei 10000 UpM
	6 * 250 ml mit 42400 g bei 16000 UpM
Kontron	: A. 8. 24. mit 46000 g bei 20000 UpM
	: A.24. 24. mit 46000 g bei 20000 UpM

2. Chemikalien

Wenn nicht anders vermerkt hatten alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien zumindestens den Reinheitsgrad "zur Analyse". Zur Herstellung aller Lösungen wurde destilliertes oder bidestilliertes Wasser verwendet.

3. Aufreinigung von Phytochrom

3.1. Sicherheitsvorkehrungen

Alle Reinigungs- und Isolierungsschritte von Phytochrom wurden unter grünem Sicherheitslicht, das Phytochrom nur minimal absorbiert durchgeführt. Um eine Peptidspaltung durch endogene Proteasen möglichst zu vermeiden, wurde entweder im Eisbad, oder im Kühlraum bei 4°C gearbeitet. Zusätzlich wurde der Serinproteaseinhibitor PMSF bei der Bereitung des Rohextrakts, der 1. Ammoniumsulfatfällung und der Resuspension dieses Präzipitats zugefügt. Als Oxidationsschutz dienten im Extraktionspuffer Na_2SO_3 , bei allen weiteren Reinigungsschritten wurde dazu β -Mercaptoethanol eingesetzt. Um Phytochromlösungen länger aufzubewahren, wurde Glycerin (5% v/v) hinzugefügt, und die Proben dann bei -30° eingefroren.

3.2. Anzucht des Pflanzenmaterials

Die Isolierung von Phytochrom wurde aus etiolierten Haferkeimlingen (*Avena sativa*, L., Sorte Pirol, ungebeizter Saathafer, Baywa München) durchgeführt. Dazu wurden 3 l Vermiculit in Plastikwannen (60 * 50 cm) mit 2 l Leitungswasser gemischt und ausgebreitet, darauf dann 2 l (300 g) Körner ausgesät und mit Lochplatten (Lochdurchmesser: 3 mm) abgedeckt. Die Samen wurde dann in einem Brutschrank (11701, Fa. Hofmann, Nellingen, Frankreich) bei 27°C und maximaler Luftfeuchtigkeit im Dunkeln zum

Keimen gebracht. Nach ca. 3,5 Tagen wurden dann die Keimlinge oberhalb der Lochplatten mit einem Spachtel abgeschnitten und direkt zur Extraktion verwendet.

3.3. Reinigung von Phytochrom

Die Aufreinigung des Phytochroms erfolgte zunächst nach der Methode von Vierstra und Quail (1983a) mit den Abwandlungen nach Grimm und Rüdiger (1986).

3.3.1. Puffer für die Aufreinigung

Puffer A: 50% Ethylenglykol, 100 mM Tris-HCl, 140 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
10 mM Na_4EDTA , 20 mM Na_2SO_3 , 4 mM PMSF, pH 8,3 (4°C);

Puffer B: 25% Ethylenglykol, 50 mM Tris-HCl, 5 mM Na_4EDTA ,
14 mM 2-Mercaptoethanol, 2 mM PMSF, pH 7.8 (4°C);

Puffer C: entspricht Puffer B, jedoch ohne Ethylenglykol und PMSF;

Puffer D: Kaliumphosphatpuffer, pH 7.8 (4°C), 5 mM EDTA,
14 mM 2-Mercaptoethanol;

Die Konzentration des Kaliumphosphats war:

$D_1 = 5 \text{ mM}$, $D_2 = 10 \text{ mM}$, $D_3 = 100 \text{ mM}$, $D_4 = 200 \text{ mM}$;

PEI-Lösung: 10% Polyethyleniminlösung; pH 7.8 (4°C,
mit HCl eingestellt);

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällungspuffer: 3.3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 mM Tris, pH 7.8;

Die frisch geernteten Keimlinge (ca. 3 kg) wurden zunächst nach Abkühlen auf 4°C 10 Minuten hellrot bestrahlt bei 660 nm ($5 \text{ J} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) und dann in einem 4 l fassenden, vorgekühlten Waring Blender im Extraktionspuffer (Puffer A), 0.75 l/kg Frischgewicht zerkleinert, zunächst portionsweise 10 sek bei niedriger, dann 1½ min bei höchster Geschwindigkeit.

Der Rohextrakt wurde mittels einer handelsüblichen Wäscheschleuder mit 6 l Edelstahltrommel (Fa. Thomas, Neunkirchen, Siegerland) durch eine Lage Leinen und feines Nylongewebe (Maschenweite: 0.075 mm; Fadenstärke: 0.040 mm) zentrifugiert.

3.3.2. Polyethylenimin-Fällung

Nukleinsäuren, Pektine und saure Proteine wurden durch Zugabe von 10 ml Polyethylenimin-Lösung (PEI) pro Liter Rohextrakt ausgefällt. Nach 15 Minuten Rühren wurde 20 Minuten bei 19000 g abzentrifugiert.

3.3.3. Ammoniumsulfat-Fällung

Der Überstand der PEI-Fällung (RE II) wurde einer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung unterzogen. 250 g pro Liter wurden langsam (20 min) zugegeben, die Lösung 1 Stunde lang gerührt, bevor sie mit 19000 g 30 Minuten lang abzentrifugiert wurde. Während der Fällung war es angeraten, den pH-Wert des Extraktes zu kontrollieren und wenn nötig, mit Tris-HCl-Puffer auf pH 7.8 zu halten.

3.3.4. Hydroxylapatit-Chromatographie

Das Pellet aus der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung wurde in Puffer B resuspendiert (4,5 ml pro Phytochromeinheit), der resultierende Extrakt noch einmal kurz abzentrifugiert (20 min, 42000g), um ungelöste Bestandteile abzutrennen. Der Überstand (RE III) wurde dann auf eine Hydroxylapatit-Säule (HA-Säule) geladen.

Säulengröße: 5 * 8 cm

Äquilibriumspuffer: Puffer B mit zusätzlich 70 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Waschpuffer: Puffer C

Elution mit linearem

Gradienten: Puffer D₁ (200 ml) und Puffer D₄ (200 ml)

Verwendet wurde zur Chromatographie industriell gefertigter HA der Firma Calbiochem, wie ihn auch Datta und Roux (1985) verwendeten. Aufreinigungsversuche mit selbst präparierten HA nach der Vorschrift von Siegelman et al. (1965) verliefen nicht zufriedenstellend.

Vor dem Füllen der Säule wurde der HA mehrmals mit H₂O bidest.

aufgeschlämmt und nach dem Absetzen der trübe Überstand, dekantiert, um feinste HA-Partikel zu entfernen und damit einen besseren Fluß der Säule zu gewährleisten. Pro Aufarbeitung wurden 150 - 175 ml Naßvolumen HA eingesetzt und das Säulenmaterial dann bis zur pH-Konstanz des Eluats mit Äquilibrierpuffer B gespült. Nach dem Auftrag des Extraktes wurde die Säule mit 2 - 3 Säulenvolumen Puffer C gewaschen, bis zur Konstanz des Schreibers des angeschlossenen Durchflußphotometers (Wellenlänge: 280 nm). Die phytochromhaltige Proteinfraktion wurde anschließend mit einem linearen Gradienten der Puffer D₁ und D₄ abgelöst und gesammelt. Proben mit $A_{666} > 0.08$ (bezogen auf Pr) wurden vereinigt und durch Versetzen mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällungspuffer, 0.65 ml pro ml Pool einer Proteinfällung unterzogen. Nach 10 Minuten Rühren und 15 Minuten Abzentrifugieren bei 42000 g, wurde das Pellet in 3.3 ml Resuspensionspuffer (=Puffer B) pro Phytochromeinheit aufgenommen. Diese Lösung wurde nun bei -30°C eingefroren, oder gleich weiter aufgereinigt.

Das HA-Säulenmaterial konnte nach intensiven Waschvorgängen noch 3 - 4 mal für erneute Säulenchromatographie verwendet werden.

Dazu wurde zunächst mit 300 mM KPP, pH 7.8, gewaschen (2 - 3 Säulenvolumen), anschließend mit 2 M KCl-Lösung (1000 ml) gespült und schließlich das HA-Material durch wiederholtes Sedimentieren und Abdekantieren des Überstands in H₂O bidest. möglichst salzfrei gewaschen.

3.4. Reinigung durch selektive Lösung von Fremdproteinen

Dies geschah nach der von Rudolf Grimm (1987) entwickelten Verfahrensweise.

Der HA-Pool in Puffer B wurde aufgetaut und einer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Präzipitation unterzogen (0.65 ml Fällungspuffer/ml Lösung). Nach Abzentrifugierung 20 Minuten bei 46000 g wurde das Pellet dann in 0.65 ml Puffer D₂ pro PE aufgenommen und erneut zentrifugiert (20 Minuten, 46000 g). Danach wurde das Pellet in 0.85 ml Puffer D₃ pro PE im Präzipitat (kann durch Messen des Pr im Überstand bestimmt werden) gewaschen und die Lösung wieder abzentrifugiert (20 Minuten bei 46000 g). Dieses Pellet wurde nun in 0.9 ml Puffer D₂

pro PE im Präzipitat gelöst. Nach erneutem Abzentrifugieren enthält nun der Überstand das aufgereinigte Phytochrom.

Alle Wasch- und Sedimentationsschritte umfaßten 20 Minuten Rühren der Lösungen bei 4°C sowie Zentrifugation 20 Minuten bei 46000 g.

Grund für diese selektive Reinigung ist die schlechte Löslichkeit von konzentriertem Phytochrom in schwachen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen (1. Waschung mit Puffer D₂) als auch in Puffern mit hoher Ionenstärke (2. Waschung mit Puffer D₃).

3.5. Polyvinylpyrrolidon-Aufreinigung

In die vorgereinigte Phytochromlösung werden 1.35 mg PVP-40000 pro PE hinzugefügt und 20 Minuten lang gerührt. Danach wurde erneut abzentrifugiert (46000 g, 20 min), der Rückstand vorsichtig mit 0.2 - 0.3 ml H₂O dest. pro PE gespült, um letzte PVP-40000 Spuren zu entfernen und dann in Puffer D₂ (10 mM KPP, 1ml pro PE) aufgenommen.

4. Markierung mit 8-Aminolävulinsäure

Entspelzte Haferkörner wurden zu diesem Zweck in großen Plastik-Petrischalen (10 pro Schale), Durchmesser 12.5 cm, die mit Filterpapierscheiben und je 6 ml H₂O bidest. versehen waren, ausgesät und bei hoher Luftfeuchtigkeit im Brutschrank bei 27°C im Dunkeln inkubiert.

Am 2. und 3. Tag wurden zum Verdunstungsausgleich je 1ml H₂O bidest. hinzugefügt, am 4. Tag wurden die Keimlinge dann geerntet. Als Markierungsmedium wurde 5-Amino [4-¹⁴C] Laevulinic Acid Hydrochloride der Firma Amersham der spezifischen Aktivität 2.04 GBq/mmol verwendet, das zu diesem Zweck in H₂O bidest. Endkonzentration 1.54 MBq/ml, gelöst, auf 2 ml Aliquots verteilt und bei - 20°C eingefroren wurde.

Dabei wurden 3 unterschiedliche Applikationstechniken angewandt:

- a) die entspelzten Körner (700) wurden in 3 ml einer ALA-Lösung, die 146.15 MBq Aktivität aufwies, für 3 Stunden zum Quellen inkubiert und dann mit dem Embryo nach oben ausgerichtet, ausgesät;
- b) die entspelzten Körner wurden am Ansatztag ausgerichtet ausgesät und jeder Embryo mit 3µl Inkubationsmedium betropft. Nach 2-3 Stunden Ruhezeit, um die Tropfen einziehen zu lassen, wurden dann erst die 6 ml H₂O auf das Filterpapier gegeben;
- c) die entspelzten Körner wurden ausgerichtet ausgesät auf bereits feuchtes Filterpapier, 1 Tag (24 Stunden) im Brutschrank inkubiert und dann erst am 2.Tag wie unter b) mit 3µl Medium auf den Embryo betropft und erneut inkubiert;

4.1. Extraktion der markierten Keimlinge und Pepsinabbau

Die Ernte erfolgte am 4. Tag, die Keimlinge wurden dabei direkt über dem Korn abgeschnitten. Nach Bestimmen des Frischgewichts wurden sie über einer Nutsche mit H₂O dest. gewaschen (250 ml). Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach Vierstra und Quail (1983a), die Keimlinge wurden bei 0°C (im Eisbad) mit 0.75 ml Extraktionspuffer pro Gramm Frischgewicht zermörsert, der Extrakt kurz abzentrifugiert (10 Min bei 10.000g) um die festen Bestandteile abzutrennen und danach, wie für die normale Phytochromisolierung bereits beschrieben, weiter behandelt. Nach Polyethylenimin- und Ammoniumsulfatfällung wurde das resultierende Pellet in 2.5 ml verdünnte HCL, pH 1.5, 50 mM Ascorbinsäure aufgenommen und 2 Stunden einem Pepsinabbau bei 37°C unterzogen (Thümmeler et al., 1981).

4.2. Auftrennung des Chromopeptids aus dem Pepsinabbau

Der Peptidextrakt nach dem Pepsinabbau wurde nach Klärung durch kurze Zentrifugation auf eine kleine Kieselgelsäure (Pasteurpipette) mit 1 ml Säulenvolumen aufgetragen. Nach Waschen mit H_2O bidest. (5 ml) und 5% Ameisensäure (1 - 2 ml) wurde das an der Säulenmatrix verbleibende Chromopeptid mit 50% Ameisensäure (2 ml) abgelöst, wobei es unter schwachen Weißlicht bei der Elution als deutlicher Bande zu erkennen war. Vom Chromopeptid Eluat wurde ein Absorptionsspektrum gemessen und daraus mit

$$\epsilon_{Pr - Peptid\ 660nm} = 32.000\ l/Mol \cdot cm$$

der Gehalt an Pr-Chromopeptid bestimmt (Brandlmeier et al., 1981).

4.3. Bestimmung der ^{14}C -Aktivität

Die Proben wurden mit 10 ml Szintillationscocktail (Rotiszint 22) versetzt und 10 Minuten in einem Szintillationszähler der Firma Kontron gezählt. Um ein Ausflocken zu verhindern, wurde bei stärker proteinhaltigen Extrakten (Rohextrakt II, Rohextrakt III) eine dem Probenvolumen entsprechende Menge an Ameisensäure zugesetzt.

Von den im Fenster A und B (fixed window ^{14}C) bestimmten cpm wurde automatisch ein vorher mit dest. H_2O in Szintcocktail bestimmtes Null-Rauschen abgezogen. Anhand einer vorher eingespeicherten Quenchkurve wurden die cpm-Werte nach der SCR-Methode (Second Channel Ration) in dpm umgerechnet. Die Aufnahme der Quenchkurve für das SCR-Verfahren erfolgte laut dem Handbuch der Firma Kontron:

Zu einer Probe mit 110.000 dpm wurden sukzessiv steigende Volumina an Aceton als Quencher zupipettiert. Die Probe wurde jeweils nach Zugabe des Acteons gemessen und danach über ein geräteinternes Programm eine Quechkurve eingespeichert.

4.4. Markierung mit [1- 14 C] oder [5- 14 C]2-Oxoglutarat

Die Inkubationsversuche, Extraktionsmethodik und Chromopeptidherstellung und Aufreinigung wurden analog zu den 8-ALA Versuchen durchgeführt. Als Markierungsmedium kam [1- 14 C]2-Oxoglutarat, NA-Salz, mit 2 GBq/mmol oder [5- 14 C]2-Oxoglutarat, NA-Salz, mit 0.562 GBq/mmol, beide von der Firma Amersham, zum Einsatz. Die Substanzen wurden in H₂O bidest. aufgenommen und die [1- 14 C]2-Oxoglutarat-Lösung dabei durch Zusetzen von nicht radioaktivem 2-Oxoglutarat auf die gleiche spezifische Aktivität wie die [5- 14 C]2-Oxoglutarat-Lösung gebracht. Der Embryo wurde nach 24 Stunden im Brutschrank erst am 2. Tag betropft und die Ernte erfolgte am 4. Tag.

5. In Vivo Inkubation von Avena Keimlingen mit Gabaculin

5.1. Inkubation und Extraktion

D, L Gabaculine-HCL von der Calbiochem-Behring Corp. wurde als 10 mM Lösung in H₂O bidest. aufgenommen und in 1 ml Mengen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Ähnlich den 14 C-Markierungsversuchen wurden dann jeweils 5 μ l davon pro Keimling direkt auf den nach oben ausgerichteten Embryo aufgetragen, und die Körner dann über Nacht bei Raumtemperatur ins Dunkle gestellt, um die Substanz ganz einziehen zu lassen. Am nächsten, dem eigentlichen Ansatztag, wurden dann je 100 behandelte Körner auf kleine Plastikpetrischalen (Durchmesser = 8.5 cm), die mit 5.5 g Vermiculit und 20 ml H₂O dest. versehen waren, ausgesät, die Schalen mit aufgelegtem Deckel in belüftete Kühltankschrankdosen gestellt und im Brutschrank bei 27°C und Lichtabschluß inkubiert. Die Keimlinge wurden je nach ihrer Länge am 3. oder 4. Tag geerntet, in flüssigem N₂ eingefroren, mit Extraktionspuffer, je nach Versuch 1 - 2 ml pro Gramm Frischgewicht zermörsert.

Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog zu den 14 C-Markierungsversuchen. Nach der Polyethyleniminfällung wurde der Gehalt an Phytochrom-Holoprotein über $\Delta\Delta$ A-Messungen in REII spektroskopisch

bestimmt. Nach der anschließenden Ammoniumsulfatfällung wurde der Protein-Niederschlag (das Pellet) in Resuspensionspuffer (=REIII) aufgenommen und für die Immunoblot-Analyse oder den proteolytischen Abbau weiterverwendet.

6. Spektralphotometrische Bestimmung der Phytochrom-Konzentration und Reinheit

Die einfachste Art Phytochrom spektroskopisch zu erfassen stellt die direkte Absorptionsmessung in klaren Lösungen dar. Allerdings sollten daneben keine anderen Pigmente vorliegen, die ebenfalls im roten Spektralbereich Absorption aufweisen, wie etwa Chlorophyll. Nach Lagarias et al. (1987) beträgt der Extinktionskoeffizient für 124 kD Hafer-Phytochrom in der Pr-Form

$$\epsilon = 1.32 \cdot 10^5 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

bei 666 nm pro Monomer. Bei einer früheren Bestimmung fanden Litts et al. (1983) einen kleineren Wert von

$$\epsilon = 1.21 \cdot 10^5 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}.$$

Nach dem neueren Koeffizienten beträgt demnach die Konzentration einer Phytochromlösung in der Pr-Form bei einer Absorption von 1.0 bei 666 nm in einer 1 cm Küvette 7.6 μM oder 1 mg/cm³. Die Bestimmung der Phytochromkonzentration in stärker streuenden, grob angereicherten Lösungen, wie sie etwa der Rohextrakt II (RE II) darstellt, erfolgte mit Hilfe der Messung der Absorptionsdifferenz $\Delta\Delta A = (A_{666} - A_{730})_{\text{Pr-Form}} - (A_{666} - A_{730})_{\text{Pfr-Form}}$, wobei in die 1. Klammer die Meßwerte nach Dunkelrotbestrahlung bei den angegebenen Wellenlängen einzusetzen sind, in die 2. Klammer diejenigen nach Hellrotbelichtung. 1 Phytochromeinheit (= 1 PE) sei als die Menge Pr definiert, die bei einer $\Delta\Delta A$ von 1 in einem Milliliter enthalten ist. Nach Vierstra und Quail (1986) können molare Konzentrationen von Phytochrom aus $\Delta\Delta A$ -Messungen durch folgende Beziehung berechnet werden:

$1.18\Delta\Delta A = 1.0 A$ bei 666 nm für die Pr-Form des 124 kD Haferphytochroms = 1 mg Protein / cm³.

Berücksichtigt man jedoch die spektralen Parameter, die Lagarias et al. (1987) bei der photochemischen Analyse von hochaufgereinigtem Haferphytochrom fanden, ergibt sich der Wert zu $1.14 \Delta\Delta A = 1.0 A$ bei 666nm. Andererseits war die von unserem Labor verwendete Aufreinigungsmethode an der Prozedur von Vierstra und Quail (1983a) orientiert, besonders was die HR-Belichtung der Keimlinge vor der Extraktion betraf. So glichen auch die Absorptionsspektren des aufgereinigten Phytochroms, denjenigen, die Vierstra und Quail (1983a,b) gemessen hatten. Als Kriterium für die Reinheit der Pr-Probe diente das Absorptionsverhältnis $A_{666} : A_{730}$ (SAR = specific absorbance ratio). Im reinen Phytochrom liegt es bei rund 1.

7. Bestimmung des Gesamtphytochromgehalts über SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese und anschließender Immunoblotanalyse

Die zu bestimmenden Proben wurden zunächst über SDS-PAGE aufgetrennt, dann durch Elektrophoretoblot in einer Kammer auf Nitrocellulose überführt und immobilisiert und dort durch Immunanfärbung sichtbar gemacht. Durch Versuche mit gereinigtem Phytochrom und Rohextrakten, bei denen die Pr-Konzentration spektroskopisch gemessen worden war, wurde jener Konzentrationsbereich ermittelt, bei dem das Signal auf dem Blot linear mit der aufgetragenen Menge an Pr zunahm. Dieser lag bei 30 - 500 μ PE pro Spur, dabei sei ein PE (=1 Phytochromeinheit) als die Menge Pr definiert, die bei einer $\Delta\Delta A$ von 1 in einem Milliliter, ein mPE als jene die bei einer $\Delta\Delta A$ von 0.001 in einem Milliliter enthalten ist. Da $1.18 \Delta\Delta A_{666/730} = 1.0 A$ bei 666 nm für Pr = 1 mg Protein (siehe Material & Methoden, spektroskop. Bestimmung, Punkt 6.) entspricht, ist demnach 1μ PE = 0.85 ng.

Zur Mengenbestimmung der unbekannten Probe, zum Beispiel der Gabaculin-behandelten Keimlinge, wurde der zu untersuchende Extrakt in abgestuften Konzentrationen mit Elektrophoresen-Probenpuffer versetzt und auf die SDS-PAGE aufgetragen. Parallel dazu wurden auf das selbe Gel Verdünnungen von Pr-Standards mit spektroskopisch ermitteltem Gehalt gegeben. Nach Ablauf von SDS-PAGE und Immunoblotanalyse konnten die aufgetragenen Phytochromproteinmengen durch Vergleich mit den Standardproben durch optischen Vergleich

bestimmt werden und die Gesamtmenge durch Rückrechnung der Verdünnung ermittelt werden. Zur Detektion von Phytochrom-Holo- sowie Apo-Protein, wurden 2 monoklonale Antikörper Z3B1 sowie CC5 im Gemisch verwendet (Schwarz und Schneider, 1987).

8. Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose (Western Blot)

Mit dieser Methode werden Polypeptide nach elektrophoretischer Trennung auf Nitrocellulose (Schleicher & Schüll BA85 0.45 µm) transferiert. Dort fixiert können auch länger dauernde immunologische Versuche mit den getrennten Polypeptiden durchgeführt werden (Towbin et al., 1979, Beisiegel, 1986).

Für den elektrophoretischen Transfer der Proteine wurde folgender Puffer verwendet: 192 mM Glyzin, 25 mM Tris, 20% Methanol, 0.05% SDS, pH 8.3.

Nach Beendigung einer Elektrophorese wurde dann folgendes Sandwich hergestellt:

- 1) Perforierte Kunststoffplatte
- 2) Kunstfasergewebe (Scotch Brite), offenporig
- 3) Papier (Whatman 3MM), zuvor im Blotpuffer angefeuchtet
- 4) Gel, das unmittelbar nach der Elektrophorese luftblasenfrei aufgelegt wird
- 5) Nitrocellulose, die ebenfalls mit Blotpuffer befeuchtet war und luftblasenfrei aufgelegt wird
- 6) Papier (vgl. 3)
- 7) Kunststoffgewebe (vgl. 2)
- 8) Perforierte Kunststoffplatte (vgl. 1)

Das Sandwich wurde in eine von der Werkstatt des botanischen Instituts gefertigten Transblotkammer mit Graphitplattenelektroden eingeschoben, wobei die Nitrocellulose zur Anode, das Gel zur Kathode orientiert war. Die Proteine wurden innerhalb von 3 Stunden bei 150 mA und 4°C (die Kammer stand währenddessen in der Kühlkammer) vollständig übertragen. Kontrollstreifen wurden 5 min in 0.1% Amidoschwarz in Methanol/Essigsäure/Wasser 40:10:50 gefärbt und in der gleichen Lösung ohne Amidoschwarz entfärbt.

9. Immunoblot

Nachdem Proteine auf Nitrocellulose durch Elektro- oder Kapillarblot übertragen und fixiert sind, kann man durch Antigen-Antikörperreaktionen jene Proteine, für die spezifische Antikörper vorliegen, sichtbar machen.

Dazu wurde ein Verfahren nach Jones und Quail (1986) angewendet. Alle Waschvorgänge und Antikörperverdünnung wurden mit Milchpuffer, 100 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.3% Magermilchpulver, 0.02% NaN_3 , durchgeführt (=MB).

Die bindingsreaktiven Stellen der Nitrocellulose wurden bei 1 Stunde Inkubation in MB, der währenddessen dreimal gewechselt wird, abgesättigt. Während aller Waschungen und Inkubationen wurde die NC und das Medium ständig sanft geschüttelt.

Danach wurde mit dem primären Antikörper inkubiert, bei monoklonalen IgG 3 Stunden, bei polyklonalen IgG 2 Stunden, Verdünnung jeweils 1:500 in MB. Dies geschah, zur Materialersparnis, wie auch die Inkubation mit dem sekundären Antikörper eingeschweißt in eine Plastikfolie.

Darauf folgte intensives Waschen mit MB für 1 Stunde, der wieder dreimal gewechselt wurde.

Nun wurde mit dem sekundären Antikörper, der mit dem Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt ist und als Antigen den primären Antikörper bindet, für 1 Stunde inkubiert. Die Verdünnung betrug in MB 1:100.

Dazu wurden folgende IgG's verwendet:

Anti-Maus IgG (Sigma A5153) bzw. mit Anti-Kaninchen IgG (Sigma A8025) alkalische Phosphatase Konjugat.

Dann wurde erneut intensiv gewaschen, für 1 Stunde mit dreimaligem Wechsel des MB.

Schließlich wurde die Nitrocellulose kurz dreimal mit H_2O dest. gewaschen, um MB-Reste zu entfernen und dann auf das Färbegelluftblasenfrei aufgelegt, mit Polyethylenfolie (=Frischhaltefolie) zum Schutz vor Austrocknen abgedeckt und bei Raumtemperatur stehengelassen.

Sobald die Färbung der Proteinbanden stark genug war (1 bis 14 Stunden), wurden Gel und Nitrocellulose voneinander getrennt, und beides mit H₂O dest. gespült, um unverbrauchtes Substrat sowie Puffer zu entfernen.

Die Nitrocellulose wurde zum Aufbewahren mit 0.02% NaN₃-Lösung versetzt in Folie eingeschweißt. Das Agarose Gel wurde zwischen 2 Cellophan-Folien eingespannt und luftgetrocknet (siehe auch Trocknen von PAG-Gelen).

Die Herstellung des Färbegels erfolgte nach Jones und Quail (1986) sowie Knecht und Dimond (1984).

Es besteht aus 2% Agar, 1mM 5-Bromo-4-Chloro-indolylphosphat (BCIP / SIGMA), sowie 0.75 M Tris, pH 9.8.

Dazu wurden 13 mg BCIP in wenig DMSO gelöst, mit 9 ml 2.5 M Tris pH 9.8 gemischt und zu 21 ml 2%-Agarlösung (600 mg Agar werden in 21 ml H₂O dest. durch Kochen gelöst) gegeben. Die noch warme Gel-lösung wird in eine vorgewärmte Kassette mit u-förmigem Abdichtungsgummi von oben eingefüllt und zum Erhärten in den Kühlschrank gestellt.

10. Transfer von Proteinen aus Agarose-Gelen auf Nitrocellulose

Bei Agarose-Gelen, die fest mit der Trägerfolie verbunden sind, ist eine elektrophoretischer Transfer in der Blotkammer nicht möglich.

Stattdessen können Proteine durch kapillare Saugkräfte transportiert werden. Dazu wurde eine Methode nach Elkon (1984) angewendet.

Das Gel wurde nach Abschluß der Fokussierung kurz an der Oberfläche mit H₂O dest. abgespült, um eventuelle Auftragsrückstände zu entfernen und dann mit der angefeuchteten Nitrocellulose luftblasenfrei bedeckt. Darauf wurden 4 - 5 Schichten feuchtes Filterpapier gelegt, gefolgt von trockenen saugfähigen Zellstofflagen, einer Glasplatte und einem $\frac{1}{2}$ kg Gewicht.

Nach 1½ - 3 Stunden wurde der Transfer abgebrochen, das Gel konnte nach Fixieren in TCA-SSA wie üblich angefärbt werden, die Nitrocellulose für die Immunoblot-Methode oder für andere Anfärbungen

weiterverwendet werden. Ein 100% quantitativer Transport der Polypeptide auf die NC konnte auf diese Weise nicht erreicht werden, ein geringer Teil verblieb im Gel und konnte dort angefärbt werden.

11. Proteolytischer Abbau von Gabaculin-behandelten Keimlings-extrakten

Der Abbau wurde mit Staphylococcus V-8 Protease (Boehringer) durchgeführt. Dazu wurden Teilvolumen der Extrakte der GABA-Versuche sowie der unbehandelten Kontrollen durch Ausfällen mit Ammoniumsulfatfällungspuffer (siehe Material und Methoden, Aufreinigung von Phytochrom) und anschließender Resuspension in 10 mM KPP-Puffer pH 7.8 (ohne PMSF) auf die gleiche Gesamtphytochromkonzentration von 100 μ PE/ μ l gebracht, anschließend mit HR oder DR belichtet und mit V-8 bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Konzentration der Protease betrug 1 μ g auf 2.5 mPE und 1 μ g auf 10 mPE. Nach verschiedenen Zeiten wurde der Abbau durch Aufkochen in Elektrophorese-Probepuffer abgestoppt, über SDS-PAGE aufgetrennt und die aus Phytochrom gebildeten Spaltprodukte über Immunoblot-Analyse sichtbar gemacht.

Dazu wurde ein Gemisch 2-er monoklonaler Antikörper, Z3B1 sowie CC5 verwendet.

12. Trennung von Proteinen durch Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen geschah durch SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Als Stammlösung wurde eine 30% Acrylamid- + 0.8% Methylenbisacrylamid-Lösung in H₂O bidest. verwendet, aus der Sammelgele und Trenngele mit verschiedenen prozentualen Acrylamidanteilen hergestellt werden konnten.

Als Laufpuffer diente eine 25 mM Tris, 192 mM Glyzin, 0.1% SDS-Lösung, pH 8.3, für den unteren Puffertank, für den oberen wurden noch 0.1% β -ME zugesetzt.

Sammelpuffer: 125 mM Tris, 0.1% SDS, pH 6.8;
 Trennpuffer: 375 mM Tris, 0.1% SDS, 3% Glyzerin, pH 8.8;
 Elektrophorese-
 probenpuffer: 65 mM Tris, 2% SDS, 15% Glyzerin, 5% β -ME,
 0.001% Bromphenol-Blau;

Trenngelrezepte für 40 ml Endvolumen:

Acrylamid-Konz. %	H ₂ O bidest ml	Trennpuffer 4*konzentriert ml	30% Acryl +0.8% MBA ml	10% APS ml	TEMED ml
4	24.1	10	5.3	0.6	0.04
5	22.7	10	6.7	0.6	0.04
6	21.4	10	8.0	0.6	0.03
7	20.1	10	9.3	0.6	0.02
8	18.8	10	10.7	0.6	0.02
9	17.4	10	12.0	0.6	0.02
10	16.1	10	13.3	0.6	0.02
11	14.7	10	14.7	0.6	0.02
12	13.4	10	16.0	0.6	0.02
13	12.1	10	17.3	0.6	0.02
14	10.7	10	18.6	0.6	0.02
15	9.4	10	20.0	0.6	0.02

Sammelpufferrezepte:

Acrylamid-Konz. %	H ₂ O bidest ml	Sammelpuffer 4*konzentriert ml	30% Acryl +0.8% MBA ml	10% APS ml	TEMED ml
2.5	6.35	2.5	1	0.15	0.01
4.5	5.85	2.5	1.5	0.15	0.01

Endvolumen = 10 ml

Acrylamid-Konz. %	H ₂ O bidest ml	Sammelgelpuffer 4*konzentriert ml	30% Acryl +0.8% MBA ml	10% APS ml	TEMED ml
7	3.51	1.75	1.63	0.105	0.03
14	1.81	1.75	3.25	0.105	0.03

Endvolumen = 7 ml

Außer Gelen mit fester Acrylamidkonzentration wurden auch solche mit einem linearen Konzentrationsgradienten verwendet.

Rezeptur für ein Gradientengel 7.5% - 15%

Acrylamid-Konz. %	H ₂ O bidest ml	Trenngel-puffer ml	60% Sucrose-Lösung ml	30% Acryl +0.8% MBA ml	10% APS ml	TEMED ml
15	--	2.93	2.93	5.85	0.025	0.004
7.5	4.92	2.93	0.94	2.92	0.025	0.008

Endvolumen = 11.75 ml * 2

Diese Gele wurden mittels eines handelsüblichen 2 Kammer-Gradientenmischer und Schlauchpumpe gegossen. Die Zugabe 60% (w/v) Sucro-selösung diente dabei zur Stabilisierung des Gradienten.

Nach dem Gießen des Trenngels wurde dies mit H₂O überschichtet. Nach abgeschlossener Polymerisation wurde das H₂O entfernt, das Sammelgel darübergegossen, ein Probenauftragskamm zur Bildung von Probenauftragstaschen hineingesteckt und nach Polymerisation wieder entfernt.

Zur elektrophoretischen Trennung wurden die proteinhaltigen Lösungen 1:5 bis 1:1, je nach Konzentration der Probe mit Elektrophorese-puffer verdünnt und anschließend für 5 Minuten bei 90' C im

Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde aufgetragen, der Lauf der Elektrophorese wurde meist über Nacht durchgeführt.

Danach wurden die Gele entweder direkt gefärbt oder, falls ein immunologischer Nachweis erfolgen sollte, auf Nitrocellulose (Schleicher & Schüll BA 85, 0.45 μm) übertragen. Die direkte Färbung erfolgte in 0.2% w/v Coomassie Brilliant Blue R 250 in 20% Essigsäure, 40% Methanol und 40% H_2O dest. für 60 Minuten. Anschließend wurde in 7% Essigsäure, 40% Methanol und 53% H_2O dest. unter mehrfachem Wechseln der Lösung entfärbt.

12.1. Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung des relativen Molekulargewichts (M_r) eines Proteins erfolgt durch Vergleich der Mobilität desselben mit derjenigen von Standardproteinen, deren Molekulargewicht bekannt ist.

Als Vergleichsstandard wurde folgende Proteine verwendet (SIGMA MW-SDS-FDL sowie MW-SDS-200 Kits).

1. α -Lactalbumin	14.2 kD
2. Trypsin-Inhibitor	20.1 kD
3. Trypsinogen	24 kD
4. Carbonic Anhydrase	29 kD
5. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (UE)	36 kD
6. Albumin, Egg	45 kD
7. Albumin, Bovine	66 kD
8. Phosphorylase b	97.4 kD
9. β -Galactosidase	116 kD
10. Myosin (UE)	205 kD

Nach Trennung auf Gelen mit einheitlicher Acrylamidkonzentration wurden die R_f -Werte der Standardproteine ermittelt und gegen den dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichts aufgetragen.

Das Molekulargewicht der zu bestimmenden Proteins wurde anschließend graphisch ermittelt, indem beim R_f -Wert desselben von der durch die Standardproteine definierten Geraden das Lot auf die Abzisse gefällt wurde. Auf dieser konnte das M_r abgelesen werden. Bei Gradientengelen wurde die Standardgerade folgendermaßen fest-

gelegt: Für die Lage eines jeden Standardproteins kam die Konzentration an Acrylamid (in %) für diese Stelle ermittelt werden. Dabei geht man davon aus, daß der Gradient linear ist. Sodann wurde der dekadische Logarithmus dieses Wertes gegen den dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts aufgetragen. Die weitere Auswertung erfolgte analog zum oben beschriebenen Verfahren.

12.2. Native Gelelektrophorese

Es wurden auch Gelelektrophoresen, ohne die zu untersuchenden Proteine vorher durch Erhitzen in Probenpuffer zu denaturieren, durchgeführt. Die Auftrennung von Peptiden in einem derartigem System erfolgt nach ihrer Ladung, ihrer Form und ihrer Größe. Dabei sollten Oligomere je nach dem Aggregationsgrad unterschiedliches Laufverhalten zeigen.

Als Laufpuffer diente eine 25 mM Tris-, 192 mM Glyzin-Lösung, pH 8.3.

Das Sammelgel hatte eine Acrylamidkonzentration von 2.5% und wurde wie bereits angegeben gegossen.

Der Sammelgelpuffer war 125 mM Tris, 3% Glyzerin, pH 7.8.

Der Trenngelpuffer war 375 mM Tris, 3% Glyzerin, pH 8.8.

Das Trenngel wurde entweder mit 8% Acrylamidkonzentration nach den Angaben unter Punkt 13. gegossen, oder wurde als Gradientengel nach folgender Rezeptur zusammengestellt.

Acrylamid-Konz. %	H ₂ O bidest ml	Trenngelpuffer ml	Glyzerin ml	30%Acryl +0.8%MBA ml	10%APS ml	TEMED ml	End-Konz. Glyz.
8	5.71	3.5	0.84	3.75	0.21	0.007	6%
4	8.03	3.5	0.42	1.87	0.21	0.014	3%

Endvolumen = 14 ml * 2

Derartige Gele wurden ebenfalls mit einem Gradientenmischer und

Schlauchpumpe gegossen. Die höhere Glyzerinkonzentration im 8%-Gel diente zur Stabilisierung des Gradienten.

Die Phytochromproben wurden vor dem Auftragen HR oder DR belichtet mit 15% Glyzerin versetzt und auf das Gel geladen. Der Lauf der Elektrophorese wurde bei 4°C abgedunkelt in der Kühlkammer durchgeführt. Als Frontmarker diente Bromphenol-Blau. Färbung und Trocknen des Gels nach dem Lauf erfolgte wie bereits beschrieben.

13. Isoelektrische Fokussierung (IEF)

13.1. Agarose-Fokussierungs-Gele (AIEF)

13.1.1. Gießen des Fokussierungs-Gels

Zum Gießen der Gele wurden die "Küvettenteknik" angewandt. Zwei Glasplatten mit den Maßen 26.5 cm * 12.5 cm, die möglichst fettfrei sein sollten, wurden mit wenigen Tropfen H₂O befeuchtet und dann eine Gelfix-Haftfolie für Agarose (Serva) auf die eine, sowie eine Gelfix-Deckfolie auf die andere Platte luftblasenfrei gewalzt. Als Abstandhalter wurde eine ein 0.75 mm dicker, u-förmiger Gummistreifen aufgelegt, die Platten zusammengeklappt, und die derart entstandene Küvette dann mit Klammern an den Seiten befestigt.

Die derart entstandene Kammer wurde im Trockenschrank für 10 Minuten bei 60°C (bei Harnstoffgelen 40°C) vorgewärmt, um ein zu vorzeitiges Erstarren des Gels beim Gießen durch zu starke Abkühlung zu vermeiden.

Für 24 ml Gelvolumen wurden folgende Substanzen verwendet:

0.24 g Agarose IEF (Pharmacia)

2.88 g Sorbit

21.6 ml H₂O bidest.

1.5 ml Servalyt 3 - 10

50 µl DTT-Lösung (10 mg/ml) entspricht Endkonz. 0.13 mM

Die Zusammensetzung entspricht, außer der Zugabe von DTT-Lösung, den von Pharmacia für ihre IEF-Agarose empfohlenen Werten.

Außer Servalyt 3 -10 wurden auch andere Trägerampholyte im gleichen Mengenverhältnis eingesetzt.

Zur Herstellung des Gels wurde die Agarose und das Sorbit unter Kochen in H₂O gelöst. Nach dem Abkühlen der entstandenen klaren Lösung auf 65°C konnten die Trägerampholyte sowie die DTT-Lösung zugesetzt und eingemischt werden. Die heiße Gellösung wurde dann zügig in die angewärmte Küvette gegossen, wobei darauf zu achten war, daß sich die Trägerfolien nicht von den Glasplatten lösten. Für Agarose-Harnstoffgele (UAIEF) wurde folgende Gelrezeptur entwickelt:

0.24 g	Agarose IEF (Pharmacia)
2.88 g	Sorbit
11.6 g	Harnstoff
13.1 ml	H ₂ O bidest.
1.25 ml	Servalyt 5 - 7
0.3 ml	Servalyt 3 -10
0.48 ml	DTT-Lösung (10 mg/ml) entspricht Endkonz. 1.3 mM

Wie bereits beschrieben wurde zunächst die Agarose und das Sorbit unter Kochen in H₂O vollständig gelöst, nach Abkühlen auf 65°C wurden Servalyt und DTT-Lösung zugegeben, und dann unter ständigem Rühren bei 50°C der Harnstoff gelöst, was die Temperatur weiter stark verminderte. Die warme Gellösung wurde in die Küvette gefüllt.

Da Agarose mit höherer Harnstoffkonzentration sehr viel langsamer fest wird, verlief dieser Vorgang weitaus unproblematischer als mit reiner Agarose-Gellösung. Zum schnelleren Abkühlen wurde die Küvette in den Kühlschrank gestellt, die obere Öffnung dabei mit Folie verschlossen um zu starke lokale Verdunstung zu verhindern.

13.1.2. Quellen der Gele

Nachdem die Agarose sich gefestigt hatte, was bei Gelen mit Harnstoff erst nach 2 -3 Stunden im Kühlschrank bei 10°C sicher der Fall war, wurde die Glasplatte, auf der die Deckfolie aufgewalzt worden war, vorsichtig abgehoben. Danach wurde die Deckfolie abgezogen und das Gel in eine Feuchteammer, z.B. einer verschließbaren Plastiksachtel mit angefeuchteten Filterpapierlagen auf dem Boden, gelegt und in den Kühlschrank gestellt. Für Harnstoff-Agarosegele sollte die Temperatur dabei nicht unter 10°C gewählt

werden um eine Auskristallisierung zu vermeiden. Meist wurden die Gele über Nacht zum Quellen inkubiert, die Zeit sollte jedoch mindestens 5 Stunden betragen und bei Harnstoffgelen maximal 24 Stunden, um eine zu hohe Wasserdampf-Aufnahme zu vermeiden.

13.1.3. Trocknen der Geloberfläche

Kurz vor dem IEF-Lauf kamen die Gele aus der Feuchtekammer und wurden mit Filterpapier (Schleicher & Schüll # 577 oder Whatman 1) oberflächlich abgetrocknet. Dazu wurde der nach Gelgröße zugeschnittene Bogen vorsichtig auf die Gelfläche gelegt und nach 15 - 30 Sekunden behutsam abgezogen (Thompson et al., 1982). Zusätzlich war das Filterpapier ebenfalls in der Feuchtekammer inkubiert worden. Diese Behandlung verminderte die Gefahr, daß das Gel bei dieser Prozedur riß oder am Papier hängen blieb.

13.1.4. Elektrodenlösungen und Probenauftrag

Als Elektrodenlösungen wurden 1 M NaOH für die Katholyt- und 0.1 M Essigsäure für die Anolytlösung verwendet. Die Elektrodenstreifen wurden aus jenem Filterpapier geschnitten, das auch zum Abtrocknen benutzt wurde. Nach Tränken in der entsprechenden Elektrodenlösung wurde sie mit Zellstoff wieder fast trockengesaugt und dann aufgelegt. Die Trennstrecke dazwischen betrug in der Regel 10 cm. Die zu analysierenden Proben wurden in ein Silicon-Applikatorstreifen (Serva) mit unterschiedliche großen Auftragstaschen (7*1mm oder 3.5*2mm) gefüllt. Diese Streifen waren meist 1/3 der Gesamttrennstrecke von der Kathodenseite entfernt auf das Gel gelegt worden. Die Proben für die IEF in Harnstoffgelen wurden ausgefällt, der Niederschlag vorsichtig mit H₂O bidest. gewaschen und dann in 8.9 M Harnstoff, 1.3 mM DTT-Lösung aufgenommen. Dies war besonders bei noch stark salzhaltigen Rohextrakten angebracht. Aufgereinigte Proteinlösungen (z.B. Phytochrom) konnten direkt verwendet werden.

13.1.5. Fokussierungs-Lauf

Die IEF wurde mit einer LKB-Multiphor II-Kammer durchgeführt, als Netzgerät diente ein Apparat der Firma Bachofer, Reutlingen, Typ E-532, mit eingebautem V·h-Integrator. Die Kühlung erfolgte mit einem thermostatgeregeltem Kühlaggregat der Firma Colora, Lorch, Typ KC 25. Die Temperatur wurde bei Harnstoffgelen auf 5°C, bei normalen Gelen auf 10 - 15°C eingestellt. Um eine gute Wärmeübertragung zu gewährleisten, wurden wenige ml Kerosin auf die Thermoplatte der IEF-Kammer gegeben, das Gel dann luftblasenfrei aufgelegt und die verschiebbaren Elektroden justiert.

Zum Teil wurden die Gele vorfokussiert bis der Stromfluß in mA auf 1/3 seines Anfangswerts zurückgegangen war, und dann erst die Proben aufgetragen. Dabei konnte jedoch keine verbesserte Auflösung festgestellt werden.

Nach Probenauftrag wurde jedesmal $\frac{1}{2}$ Stunde bei 300 Volt zum Entsalzen fokussiert, was kleine, leicht bewegliche Ionen aus der Probenfront entfernen sollte. Dann wurde in der Regel bei 26 * 11.5 cm großen Gelen bei 10°C Kühltemperatur die Leistung auf 10 Watt fixiert, das Spannungsmaximum auf 2000 Volt gesetzt. Harnstoffgele der selben Größe bei 5°C Kühltemperatur konnten mit 15 Watt konstanter Leistung fokussiert werden, die Spannung wurde auf 2500 Volt als Maximum gesetzt.

Zwischendurch wurden die Elektrodenstreifen kontrolliert und bei hohem Flüssigkeitsgehalt mit Zellstoff durch Abtupfen entfeuchtet. Während bei Harnstoffgelen bereits nach 4000 bis 5000 V·h die Fokussierung abgebrochen wurde, waren bei normalen Gelen 6000 bis 7000 V·h nötig, um aufgereinigtes Phytochrom vollständig an seinem IEP zu konzentrieren. Zum Teil wurde die IEF-Kammer während des Laufs auch mit Stickstoff oder Argon gespült, ohne daß jedoch ein Effekt auf das Bandenmuster von reinem Phytochrom zu beobachten war.

13.1.6. Fixieren, Trocknen und Färben des Gels

Nach Abbruch der Fokussierung wurden zunächst die Elektrodenstreifen entfernt, eine Ecke des Gels abgeschnitten, um die Polarität zu markieren und das an der Unterseite haftende Kerosin abgewischt. Anschließend wurde das Gel, falls es nicht für einen Kapillarblot vorgesehen war, in einer Wanne mit Fixierlösung überschichtet und auf dem Schüttler für 15 min inkubiert. Darauf wurde das Gel 2 * 15 min in Gelfärbelösung extensiv gewaschen und danach vor dem Färben trockengepreßt. Dazu wurden auf das Gel einige Lagen trockenes Filterpapier gelegt, gefolgt von einer Glasplatte, die mit einem Gewicht von etwa 1 kg beschwert wurde. Wiederum nach 15 min konnte das Gel dann mit einem elektrischen Haartrockner getrocknet werden und wurde anschließend für 5 - 10 min in die Färbelösung getaucht. Darauf folgte Inkubation in der Entfärbelösung bis die Banden vor dem klaren Hintergrund deutlich zu erkennen waren. Schließlich wurde das Gel erneut mit dem Föhn getrocknet und war nun fertig zur Auswertung und Dokumentation.

Fixierlösung: 5% Sulfosalicylsäure, 10% Trichloressigsäure in H₂O dest. (TCA/SSA);

Entfärbelösung: 40% Methanol, 7% Essigsäure in H₂O dest.;

Färbelösung: 0.2% Coomassie Blue R250 in Entfärbelösung;

Silberfärbung:

Agarose-IEF-Gele wurden teilweise auch einer Silberfärbung unterzogen. Die angewandte Methode nach Willoughby und Lambert (1983) ist dabei etwas modifiziert worden.

Die Gele waren zuvor wie oben beschrieben Coomassie-gefärbt worden, wurden dann mit mehrmaligem Wechsel 15 min in H₂O dest. gewaschen und dann mit der Färbelösung versetzt.

Diese Färbelösung setzt sich zusammen aus:

Lösung A: 1.6g Na₂CO₃ in 32ml H₂O;

Lösung B: 0.136g NH₄NO₃, 0.136g AgNO₃,
0.68g Wolframatokieselsäure (engl. Tungstosilic-
acid), 0.95ml 37%-Formaldehydlösung in H₂O,
Endvolumen der Lösung B 68ml;

Kurz vor Gebrauch wurde Lösung B unter ständigem Rühren zu A gegeben. Dann wurde diese Mischung in die Färbeschale mit dem Gel gefüllt und geschüttelt. War die gewünschte Färbung erreicht, wird abgegossen und durch Zugabe von Entfärbelösung die Reaktion abgebrochen. Danach konnte das Gel normal mit dem Föhn getrocknet werden. War eine Überfärbung eingetreten, wurde mit 4-fach verdünntem Farmer'schen Abschwächer differenziert, bis die gewünschte Zeichnung auftrat und dann durch schnelles Auswaschen in H_2O dest. abgebrochen.

Farmer'scher Abschwächer: 1g $\text{K}_3 [\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 1.6g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
(frisch herstellen) in 100ml H_2O dest. gelöst;

13.2. Polyacrylamid-Fokussierungs-Gele (PAGIEF)

13.2.1. Gießen der Gele

Auch mit Polyacrylamid-Flachgelen wurde fokussiert. Sie wurden ähnlich den Agarosegelen mittels der Kuvettentechnik gegossen. Haft- und Deckfolien wurden von der Firma Serva verwendet. Die Dicke der Gele betrug 0.5 - 1 mm.

Rezeptur:

Lösung A:	23.4% Acrylamid in Harnstoff 8.9M	3.85 ml
Lösung B:	0.6% MBA in Harnstoff 6.95M	4.27 ml
Lösung C:	8.9M Harnstoff	7.52 ml
Servalyt (verschiedene pH-Bereiche)		1.3ml ml
10% APS		0.064 ml
10% TEMED		0.021 ml

Endvolumen 17 ml, Endkonzentration an Harnstoff 7.8 M

$T = 5.3$; $C = 2.8$;

Lösung A: 15g Acrylamid werden in 50ml Lösung C gelöst;
Lösung B: 1g MBA und 88.4g Harnstoff werden in 100ml H_2O
 bidest. gelöst;
Lösung C: 177g Harnstoff werden in 200ml H_2O bidest. gelöst;

Die Angaben für die Lösungen A, B, C stammen von Thoma (1982), sie wurden portioniert und bei -20°C eingefroren.

Nachdem Lösungen A, B, C und der Servalyt gemischt waren, wurde entgast, dann APS und TEMED zugefügt und diese Mixtur in die vorbereitete Kammer gegossen. Nach erfolgter Polymerisation bei Raumtemperatur konnte das Gel bis zum Gebrauch mehrere Tage in der Kassette im Kühlschrank aufbewahrt werden. Das Quellen in der Feuchtekammer und das oberflächliche Abtrocknen, wie bei den Agarose-IEF-Gelen beschrieben, wurde bei PAG's nicht angewendet. Elektrodenlängen, Probenauftrag und Laufbedingungen waren dagegen gleich wie bei der Fokussierung in Harnstoff-Agarose-Gelen. Nach dem Lauf wurden die Gele ebenfalls in TCA/SSA fixiert, in Entfärbelösung gewaschen und dann gefärbt; also zwischendurch nicht gepreßt und getrocknet. Die Entfärbung der PAG's nahm sehr viel mehr Zeit in Anspruch, verglichen mit den Agarosegelen, und dauerte unter Umständen mehrere Tage, zudem löste sich das Gel oft von der Haftfolie.

13.2.2. Trocknen von Polyacrylamid-Gelen

SDS-PAGE und PAG-IEF-Gele wurden auf ähnliche Weise zur Dokumentation getrocknet. Nach vollständigem Entfärben wurde das Gel noch 15 min in Entfärbelösung + 5% Glyzerin inkubiert, dann zwischen 2 nasse Cellophanfolien (Einmachhaut) eingeschlossen und

- a) mit einem beheizbarem Vakuumgeltrockner der Firma LKB getrocknet oder
- b) zwischen zwei steife Plexiglasrahmen mittels Klammern eingespannt und an der Luft getrocknet.

13.3. Bestimmen des pH-Gradienten

Der pH-Gradient, der sich am Ende des IEF-Laufes eingestellt hatte, wurde durch direktes Messen mit einer pH-Oberflächenelektrode von Ingold bestimmt, oder aber durch die Verteilung von pI-Markerproteinen im fertig-gefärbten und getrockneten Gel dokumentiert.

Dabei wurden mit den zu analysierenden Proben pI-Protein-Testmischungen von Serva sowie von Pharmacia aufgetragen.

Serva: Protein-Testmischung 9: Amyloglucosidase pI 3.5, Ferritin pI 4.4, Albumin vom Rind pI 4.7, β -Lactoglobulin pI 5.34, Conalbumin pI 5.9, Myoglobin vom Pferd pI 7.3, Myoglobin vom Wal pI 8.3, Ribonuclease pI 9.45, Cytochrom C pI 10.65;

Pharmacia: Broad pI Calibration Kit (pH 3-10): Amyloglucosidase pI 3.5, methyl red (Farbstoff) pI 3.75, soybean trypsin inhibitor pI 4.55, β -Lactoglobulin A pI 5.2, bovine carbonic anhydrase B pI 5.85, human carbonic anhydrase B pI 6.55, horse myoglobin-acidic band pI 6.85, horse myoglobin-basic band pI 7.35, lentil lectin-acidic band pI 8.15, lentil lectin-middle band pI 8.45, lentil lectin-basic band pI 8.65, trypsinogen pI 9.3;

Nach Ende der Fokussierung, aber noch vor dem Fixieren des Gels wurde die Lage der basischen Bande des Pferde-Myoglobin, die durch eine rotbraune Färbung deutlich zu erkennen war, notiert und die inneren Kanten der Elektrodenstreifen markiert. Dies erleichterte nach dem Färben des Gels die Zuordnung der Banden zu den entsprechenden Proteinen und ihren maßgeblichen isoelektrischen Punkten.

In Harnstoffgelen wurden die pI-Markerproteine ebenfalls aufgetragen und dienten als Vergleichsstandard.

14. Zweidimensionale Auftrennung von Proteinen

Die zu analysierende Probe wurde zunächst über Harnstoff-AIEF oder auch PAG-IEF in der 1. Dimension aufgetrennt, und das Gel anschließend normal fixiert, wodurch die Proteine der einzelnen Spuren als milchige Banden sichtbar wurden. Nach 2* Waschen in Entfärbelösung wurde ein 0.5 cm breiter Streifen der entsprechenden Spur ausgeschnitten in H₂O dest. sowie 50mM Tris pH 7.8 neutral gespült und für 30 min bis 1 h in SDS-Probenpuffer inkubiert. Der Streifen, der weiterhin auf der Trägerfolie haften blieb, wurde

dann zwischen die Glasplatten einer vertikalen PAGE-Kammer geschoben und luftblasenfrei auf das Sammelgel gedrückt. Dort wurde er mit einer 0.1% Agaroselösung, die mit SDS-Probenpuffer zubereitet worden war, fixiert. Der Lauf der Elektrophorese, das Färben und Trocknen des Gels erfolgte wie bereits beschrieben. Zur Technik der 2D-Auftrennung mit UAIEF in der 1. Dimension sei auch auf Hirabayashi (1981) verwiesen.

15. Proteolytische Abbaumethoden zur Spaltstellen-Markierung

15.1. Abbau durch Kochen in SDS-haltigen Probenpuffer

Hierzu wurde SDS-Probenpuffer direkt in Reaktionsgefäße auf die isolierten Gelstücke gegeben. Diese wurden dann mit Parafilm fest umwickelt und im Wasserbad für 1-3 h gekocht, dabei öfter geschüttelt. Danach konnte man die noch warmen Proben (sonst erstarrt die Agarose) in die leeren, also noch nicht mit Laufpuffer überschichteten Auftragstaschen des SDS-PAGE Gels füllen.

15.2. Abbau durch Inkubation mit Ameisensäure

Die Gelstücke wurden zunächst in Reaktionsgefäßen gefriergetrocknet und dann mit 75% Ameisensäure überschichtet und 1-6 h bei 63° inkubiert. Danach wurde erneut lyophilisiert, die Proben mit je 0.2-0.5 ml H₂O + 0.1% SDS-Probenpuffer versehen und wieder gefriergetrocknet. Dies war notwendig, um noch Spuren von Ameisensäure zu entfernen. Nun konnte in SDS-Probenpuffer aufgenommen werden. War das Präparat immer noch zu sauer (gelber Umschlag des Bromphenolblau-haltigen Probenpuffers), wurde mit 0.1n NaOH neutralisiert. Danach folgte Erhitzen der Proben, um die Agarose wieder zu lösen, und der Auftrag in die leeren Kammern des SDS-PAGE Gels.

15.3. Abbau durch V-8 Protease

Die neutralgewaschenen Gelstücke wurden entweder direkt mit V-8 in wässriger Lösung inkubiert, oder der Abbau erfolgte im Sammelgel auf folgende Weise (Cleveland, 1983):

Die Gelstücke wurden durch Erhitzen in Probenpuffer, der die doppelte Glyzerinkonzentration wie sonst üblich aufwies, gelöst und in die Auftragstaschen gefüllt. Nach dem Erstarren wurde noch mit einer geringen Menge des selben Puffers überschichtet. Darauf folgte nun V-8 Protease, die in Probenpuffer mit normaler Zusammensetzung in einer Konzentration von 1-10 ng pro μ l gelöst worden war. Danach konnte die Elektrophorese angestellt werden. Sobald die Bromphenolblaufront aus dem Sammelgel gelaufen war, wurde der Stromfluß für 15-30 min unterbrochen, um einen höheren Proteolysegrad zu erreichen.

15.4. Abbau durch Trypsin

Die neutralgewaschenen Gelstücke wurden in Reaktionsgefäßen mit je 50ng Trypsin in 10 μ l 10mM KPP, pH 7.8, verschiedene Zeiten inkubiert und dann nach Zugabe von Probenpuffer und Erhitzen in die Kammern des SDS-PAGE Gels gefüllt.

16. Enzymatische Testverfahren auf posttranslationale Modifikationen und Chromophornachweis

16.1. Inkubation mit alkalischer Phosphatase

Dazu wurden je 100 μ l Phytochromlösung in 10 mM KPP, pH 7.8 in Pr- und Pfr-Form (70 μ g) entweder direkt mit 0.1 U alkalische Phosphatase (Boehringer) versetzt, oder noch zusätzlich mit 100 μ l Glyzin-Puffer 0.1 M, 1 mM Mg^{2+} , 0.1 mM Zn^{2+} , pH 9.8 verdünnt und dann 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Ausfällen mit dem gleichen Volumen Ammoniumsulfatfällungspuffer wurde in 40 μ l 8.9 M Harnstoff, 1.3 mM DTT aufgenommen und über UAIEF aufgetrennt.

16.2. Inkubation mit Phosphodiesterase

Dazu wurden je 50 μ l Phytochromlösung in 10 mM KPP, pH 7.8 in Pr- und Pfr-Form (35 μ g) ebenfalls entweder direkt mit 0.02 U Phosphodiesterase (Phospholipase D, Boehringer) versetzt, oder zusätzlich noch mit 150 μ l 0.1 M Na-Acetatpuffer pH 5.8, 150 mM CaCl_2 verdünnt und 1 h bei 20°C inkubiert. Nach Ausfällen mit dem gleichen Volumen Ammoniumsulfatfällungspuffer wurde in 30 μ l 8.9 M Harnstoff, 1.3 mM DTT aufgenommen und über UAIEF aufgetrennt.

16.3. Inkubation mit Neuraminidase

Hierzu wurden je 100 μ l Phytochromlösung in 10 mM KPP, pH 7.8 in Pr- und Pfr-Form (70 μ g) entweder direkt mit 5 μ l Neuraminidase (Boehringer) gemischt, oder noch zusätzlich mit Na-Acetatpuffer 50 mM, pH 5.5, 154 mM NaCl, 4mM CaCl_2 versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Ausfällen mit dem gleichen Volumen Ammoniumsulfatfällungspuffer wurde in 40 μ l 8.9 M Harnstoff, 1.3 mM DTT aufgenommen und über UAIEF aufgetrennt.

16.4. Chromophornachweis

Zum Nachweis des Chromophors in den fokussierten Isobanden wurde eine Methode nach Berkelman und Lagarias (1986), modifiziert nach Grimm (1987) angewandt. Proteine und Peptide mit einem kovalent gebundenen, linearen Tetrapyrrol können dabei nach der Bildung eines Zinkkomplexes durch Anregung mit UV-Licht als fluoreszierende Banden sichtbar gemacht werden.

Dazu wurde ein in fixiertes, aber noch nicht gepreßtes und ungefärbtes UAIEF-Gelstück (oder auch ein geblottetes NC-Stück) mit Isobanden neutralgewaschen und dann für 30 min in 20 mM Zn-Acetat, 150 nM Tris/HCl, pH 7 inkubiert. Anschließend wurde mit einer 40 W UV-Lampe bei 302 nm angeregt, wobei die Banden orange fluoreszierten.

17. In vitro Translation und Immunpräzipitation

17.1. Isolation von Gesamt-RNA aus Haferkeimlingen

Glasgeräte und Mörser wurden vor Gebrauch für ca. 4 Stunden mit trockener Hitze (200°C) behandelt. Wässrige Lösungen und empfindliche Geräte (Zentrifugenröhrchen, Schraubdeckel usw.) wurden autoklaviert (20 Minuten).

Die folgenden Angaben beziehen sich auf die Aufarbeitung von 10 g 3-tage alten Keimlingen. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Isolationssschritte bei 0°C ausgeführt.

Extraktionspuffer: 50 mM Tris-Acetat, pH 8.5; 100 mM Na-Acetat,
10 mM EDTA, 1% SDS;

Phenol: Phenol + 0.1% 8-Hydroxylquinolin, zubereitet nach
Maniatis (1982);

Chloroform/Isoamylalkohol: 24:1 (v/v)

Die Keimlinge wurden in flüssigem Stickstoff pulverisiert und dann zu einer auf 90°C erwärmten Mischung aus 25 ml Extraktionspuffer und 25 ml Phenol gegeben und für 5 Minuten auf dem Whirl-Mix vermenget.

Danach wurden 25 ml Chloroform-Isoamyl zugefügt und erneut 5 Minuten gemischt. Nun wurde das Gemisch auf Eis abgekühlt und bei 16000 RpM 15 Minuten zentrifugiert.

Die H₂O-Phase wurde dann in einem Scheidetrichter zweimal mit dem gleichen Volumen eines 1:1-Gemisches aus Phenol/Chloroform und anschließend mit Chloroform-Isoamyl ausgeschüttelt.

Der Überstand (H₂O-Phase) wurde nun mit einer 8 M LiCl-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 2 M versetzt und mindestens 3 Stunden im Eisbad stehen gelassen (zur Fällung der RNA).

Danach folgte eine Zentrifugation (20 Minuten bei 30000 g). Der Rückstand wurde dann einmal mit 2 M LiCl-Lösung und zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Es wurde noch einmal abzentrifugiert, das resultierende Pellet im Vakuum getrocknet und dann in H₂O bidest. aufgenommen. Die Konzentration wurde spektral photometrisch bei 260 nm bestimmt (Bonner, 1968), 1 OD₂₆₀ entspricht dabei 40 µg RNA pro µl Lösung. Bei ganzen Keimlingen wurden pro 10 g Frischgewicht durchschnittlich 10 mg tot-RNA isoliert, mit Koleoptilen dagegen nur etwa 1 mg.

Die auf diese Weise gewonnene RNA wurde entweder in flüssigem Stickstoff eingefroren oder noch einer Ethanol-Präzipitation unterzogen. Dazu wurden 0.2 Volumeneinheiten 10 M Ammoniumacetat und 2.2 Vol. Ethanol (bezogen auf das Volumen der RNA-Lösung) zugefügt und bei -30°C über Nacht gefällt.

17.2. Oligo-dT-Cellulose-Chromatographie

Um aus der total-RNA die Poly-A-RNA zu isolieren, wurde Oligo-dT-Cellulose-Chromatographie angewandt.

Dazu wurde die ethanolpräzipitierte tot-RNA abzentrifugiert (20 min 30000 g), der Rückstand dann mit 3 ml 0.5 M LiCl, 1% SDS, 1 mM EDTA und 3 μl RNA'sin (RNA'se Inhibitor) aufgenommen und mit 3 ml Adsorptionspuffer (20 mM Tris pH 7.5, 0.5 M LiCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 1 $\mu\text{l}/100\text{ml}$ RNA'sin) vermischt. 1 g Oligo-dT-Cellulose wurde in H_2O bidest. aufgeschlämmt und mit Adsorptionspuffer äquilibriert (Säulenvolumen 3.0 ml). Die RNA-Lösung wurde aufgetragen, die Säule noch einmal mit 6 ml Adsorptionspuffer nachgespült und die Elution spektralphotometrisch bei 260 nm verfolgt. Die durchgelaufene RNA-Lösung wurde erneut aufgetragen, die Säule anschließend mit 6 ml Adsorptionspuffer und dann mit 18 ml Waschpuffer (20 mM Tris pH 7.5, 0.1 M LiCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 1 $\mu\text{l}/100\text{ml}$ RNA'sin) gespült. Schließlich wurde mit 5 ml H_2O bidest. abgelöst. Die Ausbeute an Poly-A-RNA betrug 600 μg aus 10 mg aufgetragener tot-RNA (bei ganzen Keimlingen). Die Poly-A-RNA wurde anschließend einer Ethanol-Präzipitation unterzogen (siehe oben), das Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet, in H_2O bidest. aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

17.3. In vitro Translation

Als zellfreies Translationssystem diente in allen Versuchen Kaninchen-Retikulozyten-Lysat. Es wurden Präparate zweier verschiedener Firmen verwendet, BRL und Amersham Buchler. Beide Lysate waren zur Reduktion endogener m-RNA-Aktivitäten Nuklease behandelt worden und waren entsprechend der Methode von Pelham und Jackson (1976) hergestellt worden. Die ursprünglichen Konzentrationen von Mg^{2+} und K^+ wurden optimiert, um einen möglichst hohen Einbau zu erhalten. Als radioaktive Aminosäure wurde ^{35}S -Methionin in die in vitro synthetisierte Proteine eingebaut.

Ein Standard-Ansatz enthielt unter Verwendung von BRL-Lysat:

1 μ l	^{35}S -Methionin (370 - 555 kBq)
3 μ l	reaction mixture (Aminosäuren, Kreatinphosphat,...)
1.3 μ l	K-Acetat, 2 M
10 μ l	BRL-Lysat
14.7 μ l	H ₂ O und RNA-Lösung
Endvolumen 30 μ l, 134 mM K^+ , 1.16 mM Mg^{2+} ;	

bei Amersham-Lysat:

1 μ l	^{35}S -Methionin (370 - 555 kBq)
2 μ l	AA-Mix (Aminosäuren, Kreatinphosphat,...)
1.1 μ l	K-Acetat, 2 M
16.7 μ l	Amersham-Lysat
9.2 μ l	H ₂ O und RNA-Lösung
Endvolumen 30 μ l, 134 mM K^+ , 1 mM Mg^{2+} ;	

Die Ansätze wurden 60 Minuten bei 30°C im Wasserbad inkubiert, die Translation wurde durch rasches Abkühlen auf 0°C gestoppt. Zur Bestimmung des Gesamteinbaus von ^{35}S -Methionin wurden je 3 μ l Aliquot entnommen und zu 1.5ml 1M NaOH (+5%v/v einer 30% H₂O₂-Lsg.) gegeben und für 10 min bei 37°C inkubiert (Amino-Acyl-tRNA-Hydrolyse). Danach wurde wieder auf 0°C abgekühlt, je 6 ml eiskalte 25% TCA-Lösung (TCA 25% + 2%v/v Caseinhydrolysat) zugegeben und mindestens 30 min zur Präzipitation stehen gelassen. Die ausgefällten Proteine wurden dann auf Glasfilter (Whatman GF/C) aufgetragen und je 2* mit je 9 ml 8% TCA gewaschen. Nach dem Trocknen der Filterscheiben (20 min bei 100°C) wurde die Radioaktivität der Proben

mit je 10 ml Szintillationscocktail (Rotiszint 22) bestimmt. Für die verschiedenen mRNA-Präparationen wurde der Konzentrationsbereich getestet, in dem die induzierte Gesamtsynthese linear zur angebotenen Menge an mRNA zunahm. Aus diesem Bereich wurden dann die Konzentrationen gewählt, die für vergleichende Untersuchungen verschiedener mRNA's benutzt wurden.

Für Poly A-RNA's betrug die pro Translationsansatz eingesetzte Menge im Allgemeinen $\approx 0.7 \mu\text{g}$, für tot-RNA's $\approx 2 \mu\text{g}$. Sie wurden vor Beginn der Translation noch für 10 min auf 60°C erhitzt und dann schnell abgekühlt um eventuelle Sekundärstrukturen von großen RNA-Molekülen zu eliminieren. Aus dem Hauptteil des Translationsansatzes wurde versucht, mit Hilfe phytochromspezifischer Antikörper die entsprechenden Translationsprodukte zu isolieren.

17.4. Immunpräzipitation des Pr-Apoproteins aus den in vitro Translationsansätzen

Der Hauptteil des Translationsansatzes (28-25 μl) wurde nun mit 250 μl RIA-Puffer + BSA (10mM Tris/HCl pH 7.5, 0.9% NaCl, 1% BSA = Rinderserumalbumin, 0.05% Triton X-100) und 10 μl 0.25 M Methioninlösung vermischt. Dazu wurden 10 μl Antikörperlösung pipettiert, erneut gemixt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

5 mg Protein A Sepharose wurden 3* mit je 2 ml RIA-Puffer ohne BSA angequollen und gewaschen, die Immunpräzipitationsmischung zugegeben und 1h bei Raumtemperatur unter sanftem Schütteln inkubiert. Danach wurde die Lösung über eine kleine Säule (blaue Pipettenspitze mit Glaswolle als Fritte) gegeben, und die Sepharose Protein A Matrix mit 2.5 ml RIA-Puffer + BSA + Methionin gefolgt von 2 ml 33% RIA-Puffer + Methionin aber ohne BSA gewaschen und schließlich mit 8.9 M Harnstofflösung, 2mM DTT oder auch Elektrophoresepuffer eluiert. Die Immunpräzipitate wurden dann über UAIEF und auch SDS-PAGE aufgetrennt und fluorographisch sichtbar gemacht.

17.5. Autoradiographie

17.5.1. Polyacrylamid-Gele

Die Gele wurden normal gefärbt, aber nur schwach entfärbt und dann für insgesamt 90 Minuten in Dimethylsulfoxid (DMSO) entwässert, das dabei einmal gewechselt wurde. Dabei wurden die Gele weiter entfärbt, die Molekulargewichtsmarker sollten aber noch deutlich sichtbar bleiben. Danach war der Restgehalt an Wasser im Gel so gering, daß das Gel in eine PPO-Lösung (26 g PPO + 120 ml DMSO) gelegt werden konnte, ohne daß PPO ausfiel (Bonner und Laskey, 1974). Nach 4 Stunden Inkubation wurde das im Gel verteilte PPO durch Wasserzugabe ausgefällt und zur vollständigen Rehydratisierung noch mehrfach in H_2O dest. gewaschen. Danach wurden die Gele wie beschrieben getrocknet. Zur Autoradiographie wurden Röntgenfilme der Marken AGFA und KODAK verwendet, exponiert wurden die Gele bei $-80^{\circ}C$.

17.5.2. Agarose-Gele

Agarose-Fokussierungsgele wurden normal fixiert, gepresst, getrocknet und gefärbt. Das trockne Pherogramm wurde dann nur kurz (1 - 2 Minuten) in DMSO-PPO-Lösung gelegt und danach sofort in H_2O dest. gewaschen. Bei längerer Inkubationsdauer löste sich sonst unter Einfluß des DMSO die getrocknete Agaroseschicht auf. Nach gutem Wässern wurden die Gele an der Luft oder mit dem Föhn getrocknet und zur Radiographie benutzt. Bei Immunpräzipitationen betrug die Expositionszeit der Gele bis zu 5 Wochen.

V. Literaturverzeichnis

- Anderson, N.L. und Hickman, B.J. (1979):
Isoelectric point standards for two dimensional electrophoresis.
Anal. Biochem., **93**, 312-320.
- Balangé, A.P. und Rollin, P. (1973):
Purification of photoreversible phytochrome from Avena seedlings by isoelectric focusing.
Plant Science Letters, **1**, 59-64.
- Beale, S.J. (1978):
 δ -Aminolevulinic acid in plants: Its biosynthesis, regulation and role in plastid development.
Annu. Rev. Plant. Physiol., **29**, 95-120.
- Beale, S.J. und Foley, T. (1982):
Induction of δ -aminolevulinic acid synthase activity and inhibition of heme synthesis in *Euglena gracilis* by N-methyl mesoporphyrin IX.
Plant Physiol., **69**, 1331-1333.
- Beale, S.J. und Cornejo, J. (1983):
Biosynthesis of phycocyanobilin from exogenous labeled Biliverdin in *Cyanidium caldarium*.
Archives of Biochemistry and Biophysics, **227**, 279-286.
- Beisiegel, U. (1986):
Protein blotting.
Electrophoresis, **7**, 1-18.
- Berkelman, T.R. und Lagarias, J.C. (1986):
Visualization of bilin-linked peptides and proteins in polyacrylamide gels.
Anal. Biochem., **156**, 194-201.
- Bolton, G.W. und Quail, P.H. (1982):
Cell-free synthesis of phytochrome apoprotein.
Planta, **155**, 212-217.
- Bonner, B.A. (1967):
Incorporation of δ -aminolevulinic acid into the chromophore of phytochrome.
Plant Physiol., **42**, S11.

Bonner, J. (1968):

Isolation and characterization of chromosomal nucleoproteins.

In: Methods of enzymology, ed. by L. Grossman and K. Moldave, Vol. XII, 47.

Bonner, W.M. und Laskey, R.A. (1974):

A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels.

Eur. J. Biochem., **46**, 83-88.

Brandlmeier, T., Scheer, H. und Rüdiger, W. (1981):

Chromophore content and molar absorptivity of phytochrome in the Pr-form.

Z. Naturforsch., **36c**, 431-439.

Briggs, W.R. und Iino, M. (1983):

Blue-light-absorbing photoreceptors in plants.

Philos. Trans. R. Soc. London Ser.B, **303**, 347-359.

Brown, S.B., Holroyd, J.A. und Vernon D.I. (1984):

Biosynthesis of phycobiliproteins.

Biochem. J., **219**, 905-909.

Butler, W.L., Siegelman, H.W. und Miller, C.O. (1964):

Denaturation of phytochrome.

Biochem., **3**, 851-857.

Castelfranco, P.A. und Beale, S.I. (1983):

Chlorophyll biosynthesis: Recent advances and areas of current interest.

Ann. Rev. Plant Physiol., **34**, 241-278.

Cha, T.A., Maki, A.H. und Lagarias, J.C. (1983):

Low temperature luminescence characterization of 124kD-phytochrome from Avena sativa.

Biochem., **22**, 2846-2851.

Chai, Y.G., Singh, B.R., Song, P.S., Lee, J. und Robinson, G.W.

(1987a):

Purification and spectroscopic properties of 124kD oat phytochrome.

Anal. Biochem., **163**, 322-330.

- Chai, Y.G., Song, P.S., Cordonnier, M.M. und Pratt, L.H. (1987b):
A photoreversible circular dichroism spectral change in oat phytochrome is suppressed by a monoclonal antibody that binds near its N-terminus and by chromophore modification. *Biochemistry*, **26**, 4947-4952.
- Chibbar, R.N. und Van Huystee, R.B. (1986):
Site of haem synthesis in cultured peanut cells. *Phytochemistry*, **25**, 585-587.
- Cleveland, D.W. (1983):
Peptide mapping in one dimension by limited proteolysis of SDS-solubilized proteins. *Methods Enzymol.*, **96**, 222-229.
- Colbert, J.T., Hershey, H.P. und Quail, P.H. (1983):
Autoregulatory control of translatable phytochrome mRNA levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 2248-2252.
- Colbert, J.T., Hershey, H.P. und Quail, P.H. (1985):
Phytochrome regulation of phytochrome m-RNA abundance. *Plant Mol. Biol.*, **5**, 91-101.
- Cordonnier, M.M. und Pratt, L.H. (1982a):
Immunopurification and initial characterization of dicotyledonous phytochrome. *Plant Physiol.*, **69**, 360-365.
- Cordonnier, M.M. und Pratt, L.H. (1982b):
Comparative phytochrome immunochemistry as assayed by antisera against both monocotyledonous and dicotyledonous phytochrome. *Plant Physiol.*, **70**, 912-916.
- Cordonnier, M.M., Greppin, H. und Pratt, L.H. (1985):
Monoclonal antibodies with differing affinities to the red-absorbing and far-red-absorbing forms of phytochrome. *Biochemistry*, **24**, 3246-3253.
- Correll, D.L. und Shropshire, W.jr. (1968):
Phytochrome in etiolated annual rye. I. Changes during growth in the amount of photoreversible phytochrome in the coleoptile and primary leaf. *Planta*, **79**, 275-283.

Creighton, T.E. (1979):

Electrophoretic analysis of the unfolding of proteins by urea.

J. Mol. Biol., **129**, 235-264.

Datta, N. und Roux, S.J. (1985):

A rapid procedure for the purification of 124 kD phytochrome from Avena.

Photochem. Photobiol., **41**, 229-232.

Dunn, M.J. und Burghes A.H.M. (1983):

High resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis.

Electrophoresis, **4**, 97-116.

Eilfeld, P. und Rüdiger, W. (1984):

On the reactivity of native phytochrome.

Z. Naturforsch., **39c**, 742-745.

Elich, T.D. und Lagarias, J.C. (1987):

Phytochrome chromophore biosynthesis.

Plant Physiol., **84**, 304-310.

Elkon, K.B. (1984):

Isoelectric focusing of human IgA and secretory proteins using thin layer agarose gels on nitrocellulose capillary blotting.

J. Immunol. Methods, **66**, 313-321.

Flint, D.H. (1984):

Gabaculine inhibits δ -ALA synthesis in chloroplasts.

Plant Physiol., **75**, S-965.

Fondeville, J.C., Borthwick, H.A. und Hendricks, S.B. (1966):

Leaflet movement of Mimosa pudica, L. I. Identification of phytochrome action.

Planta, **69**, 357-364.

Fry, K.T. und Mumford, F.E. (1971):

Isolation and partial characterization of a chromophore-peptide fragment from pepsin digest of phytochrome.

Biochem. Biophys. Res. Commun., **45**, 1466-1473.

Gardner, G. und Gorton, H.L. (1985):

Inhibition of phytochrome synthesis by gabaculine.

Plant Physiol., **77**, 540-543.

Gianazza, E. (1977):

In: Electrofocusing and Isotachophoresis, S.293.

Radola, B.J. und Graesslin, D. (Hrsgb.), de Gruyter Verlag, Berlin.

Gottmann, K. und Schäfer, E. (1982):

In vitro synthesis of phytochrome apoprotein directed by mRNA from light and dark grown Avena seedlings.

Photochem. Photobiol., **35**, 521-525.

Gottmann, K. und Schäfer, E. (1983):

Analysis of phytochrome kinetics in light-grown Avena sativa L. seedlings.

Planta, **157**, 392-400.

Grimm, R. und Rüdiger, W. (1986):

A simple and rapid method for isolation of 124 kDa oat phytochrome.

Z. Naturforsch., **41c**, 988-992.

Grimm, R., Lottspeich, F., Schneider, H-J.A.W. und Rüdiger, W.

(1986):

Investigation of the peptide chain of 124 kDa phytochrome: Localization of proteolytic fragments and epitopes for monoclonal antibodies.

Z. Naturforsch., **41c**, 993-1000.

Grimm, Rudolf (1987):

Untersuchungen über die Peptidkette von Phytochrom aus etioliertem Hafer.

Dissertation München.

Grombein, S., Rüdiger, W. und Hampp, R. (1978):

Destruction and possible de novo synthesis of phytochrome in subcellular fractions of laminae from Avena sativa L.

Planta, **141**, 273-277.

Hamilton, B., Hofbauer, R. und Ruis, H. (1982):

Translational control of catalase synthesis by hemin in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Proc. Natl. Acad. Sci., **79**, 7609-7613.

Hartmann, K.M. (1966):

A general hypothesis to interpret " high energy phenomena" of photomorphogenesis on the basis of phytochrome.

Photochem. Photobiol., **5**, 349-366.

Haupt, W. (1982):

Light-mediated movement of chloroplasts..

Ann. Rev. Plant Physiol., **33**, 205-233.

Hershey, H.P., Barker, R.F., Idler, K.B., Lissemore, J.L.
und Quail, P.H. (1985):

Analysis of cloned cDNA and genomic sequences for
phytochrome: Complete amino-acid sequences for two gene
products expressed in etiolated Avena.

Nuc. Acids Res., **13**, 8543-8559.

Hirabayashi, T. (1981):

Two-dimensional gel electrophoresis of chicken skeletal
muscle proteins with agarose gels in the first dimension.

Anal. Biochem., **117**, 443-451.

Hunt, R.E. und Pratt, L.H. (1979):

Phytochrome immunoaffinity purification.

Plant Physiol., **64**, 332-336.

Hunt, R.E. und Pratt, L.H. (1980):

Partial characterization of undegraded oat phytochrome.

Biochemistry, **19**, 390-394.

Hunt, R.E. und Pratt, L.H. (1981):

Physiochemical differences between the red- and the far-red
absorbing forms of phytochrome.

Biochemistry, **20**, 941-945.

Jones, A.M., Vierstra, R.D., Daniels, S.M. und Quail, P.H. (1985):

The role of separate molecular domains in the structure of
phytochrome from Avena sativa.

Planta, **164**, 501-506.

Jones, A.M. und Quail, P.H. (1986):

Quaternary structure of 124-kilodalton phytochrome from
Avena sativa L.

Biochemistry, **25**, 2987-2995.

Jones, A.M., Allen, C.D., Gardner, G. und Quail, P.H. (1986):

Synthesis of phytochrome apoprotein and chromophore are not
coupled obligatorily.

Plant Physiol., **81**, 1014-1016.

- Jordan, B.R., Partis, M.D. und Thomas, B. (1984):
A study of phytochrome-membrane association using an enzyme-linked immunosorbent assay.
Physiol. Plant., **60**, 416-421.
- Knecht, D.A. und Dimond, R.L. (1984):
Visualization of antigenic proteins in western blots.
Anal. Biochem., **136**, 180-184.
- Kronenberg, G.H.M. und Kendrick, R.E. (1986):
The physiology of action.
In: Photomorphogenesis in plants, p.99, R.E. Kendrick und G.H.M. Kronenberg, Herausgeber. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster.
- Laemmli, U.K. (1970):
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature, **227**, 680-685.
- Lagarias, J.C. und Rapoport, H. (1980):
Chromopeptides from phytochrome.
J. Am. chem. Soc., **102**, 4821-4828.
- Lagarias, J.C. und Mercurio, F.M. (1985):
Structure-function studies on phytochrome. Identification of light-induced conformational changes in 124-kDa Avena phytochrome in vitro.
J. Biol. Chem., **260**, 2415-2423.
- Lagarias, J.C., Kelly, J.M., Cyr, K.L. und Smith, W.O. (1987):
Comparative photochemical analysis of highly purified 124 kD oat and rye phytochromes in vitro.
Photochem. Photobiol., **46**, 5-13.
- Leatham, G.F., King, V. und Stahmann, M.A. (1980):
In vitro protein polymerization by quinones or free radicals generated by plant or fungal oxidative enzymes.
Phytopathology, **70**, 1134-1140.
- Lissemore, J.L., Colbert, J.T. und Quail, P.H. (1987):
Cloning of cDNA for phytochrome from etiolated Cucurbita and coordinate photoregulation of the abundance of two distinct phytochrome transcripts.
Plant Mol. Biol., **8**, 485-496.

- Litts, J.C., Kelly, J.M. und Lagarias, J.C. (1983):
 Structure-function studies on phytochrome: Preliminary characterization of highly purified phytochrome from *Avena sativa* enriched in 124 kD species.
 J. Biol. Chem. Soc., **258**, 11025-11031.
- Mackenzie, J.M., Coleman, R.A., Briggs, W.R. und Pratt, L.H. (1975):
 Reversible redistribution of phytochrome within the cell upon conversion to its physiologically active form.
 Proc. Natl. Acad. Sci., **72**, 799-803.
- Mackenzie, J.M., Briggs, W.R. und Pratt, L.H. (1978):
 Phytochrome photoreversibility: Empirical test of the hypothesis that it varies as a consequence of compartmentalization.
 Planta, **141**, 129-134.
- Malamud, D. und Drysdale, J.W. (1978):
 Isoelectric points of proteins: A table.
 Anal. Biochem., **86**, 620-647.
- Mandoli, D.F. und Briggs, W.R. (1984):
 Lichtleiter in Pflanzen.
 Spektrum der Wissenschaft, Oktober 1984, 120-129.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J. (1982):
 Molecular cloning. A laboratory manual.
 Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor laboratory.
- Marmé, D. (1977):
 Phytochrome: Membranes as possible sites of primary action.
 Ann. Rev. Plant Physiol., **28**, 173-198.
- Mc Curdy, D.W. und Pratt, L.H. (1986):
 Kinetics of intracellular redistribution of phytochrome in *Avena* coleoptiles after its photoconversion to the active, far-red-absorbing form.
 Planta, **167**, 330-336.
- Meller, E. und Gassman, M.L (1982):
 Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid: Two pathways in higher plants.
 Plant Sci. Lett., **26**, 23-29.

Mohr, H. (1966):

Differential gene activation as a mode of action of phytochrome..

Photochem. Photobiol., **5**, 469-483.

O'Farell, P.H. (1975):

High resolution two dimensional electrophoresis of proteins.

J. Biol. Chem., **250**, 4007-4021.

Olsson, J. und Laas, T. (1981):

Isoelectric focusing in agarose under denaturing conditions.

J. Chromatogr., **215**, 373-378.

Otto, V., Schäfer, E., Nagatani, A., Yamamoto, K.T. und Furuya, M. (1984):

Phytochrome control of its own synthesis in *Pisum sativum*.
Plant Cell Physiol., **25**, 1579-1584.

Pelham, H.R.B. und Jackson, R.J. (1976):

An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates.

Eur. J. Biochem., **67**, 247-256.

Piszkiewicz, D., Landon, M. und Smith, E.L. (1970):

Anomalous cleavage of aspartyl-proline peptide bonds during amino acid sequence determinations.

Biochem. Biophys. Res. Com., **40**, 1173-1178.

Porra, R.J., Klein, O. und Wright, P.E. (1983):

The proof by ^{13}C -NMR spectroscopy of the predominance of the C₅ pathway in chlorophyll biosynthesis in higher plants and of the formation of the methyl ester group of chlorophyll from glycine.

Eur. J. Biochem., **130**, 509-516.

Pratt, L.H. und Coleman, R.A. (1974):

Phytochrome distribution in etiolated grass seedlings as assayed by an indirect antibody-labelling method.

Amer. J. Bot., **61**, 195-202.

Pratt, L.H. (1982):

Phytochrome: The protein moiety.

Annu. Rev. Plant Physiol., **33**, 557-582.

Pratt, L.H. (1986):

Localization within the plant.

In: Photomorphogenesis in plants, p.61, R.E. Kendrick und G.H.M. Kronenberg, Herausgeber. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster.

Quail, P.H., Schäfer, E. und Marmé, D. (1973):

Turnover of phytochrome in pumpkin cotyledons.

Plant Physiol., **52**, 128-134.

Rando, R.R. (1977):

Mechanism of the irreversible inhibition of γ -aminobutyric acid- α -ketoglutaric acid transaminase by the neurotoxin gabaculine.

Biochemistry, **16**, 4604-4610.

Richter, G. (1982):

Stoffwechselphysiologie der Pflanzen.

G.Thieme, Stuttgart, 4.Auflage.

Righetti, P.G. (1983):

General experimental aspects.

In: Isoelectric focusing: theory, methodology and applications, S.293, P.G. Righetti (Hrsgb.), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford.

Rittenhouse, J. und Marcus, F. (1984):

Peptide mapping by PAGE after cleavage at aspartyl-prolyl bonds in SDS containing buffers.

Anal. Biochem., **138**, 442-448.

Roux, S.J., Lisansky, S.G. und Stoker, B.M. (1975):

Purification and partial carbohydrate analysis of phytochrome from *Avena sativa*.

Physiol. Plant, **35**, 85-90.

Roux, S.J. (1986):

Phytochrome and membranes.

In: Photomorphogenesis in plants, p.115. R.E. Kendrick und G.H.M. Kronenberg, Herausgeber. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster.

Rüdiger, W. (1969):

Chromsäure- und Chromatabbau von Gallenfarbstoffen.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **350**, 1291-1300.

- Rüdiger, W., Brandlmeier, T., Blos, I., Gossauer, A. und Weller, J.P. (1980):
Isolation of the phytochrome chromophore. The cleavage reaction with hydrogen bromide.
Z. Naturforsch., **35c**, 763-769.
- Rüdiger, W. (1980):
Phytochrome, a light receptor of plant photomorphogenesis.
In: Structure and Bonding, **40**, Hemmerich, P. ed., 101-140, Springer-Verlag, Berlin.
- Rüdiger, W. (1983):
Chemistry of the phytochrome photoconversions.
Phil. Trans. Roy. Soc., London B., **303**, 377-385.
- Rüdiger, W., Thümmel, F., Cmiel, E. und Schneider, S. (1983):
Chromophore structure of the physiologically active form (Pfr) of phytochrome.
Proc. Natl. Acad. Sci., **80**, 6244-6248.
- Rüdiger, W. (1986):
The chromophore.
In: Photomorphogenesis in plants, p.17, R.E. Kendrick und G.H.M. Kronenberg, Herausgeber. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster.
- Schropp, E. (1986):
Untersuchungen zur Lösung und Knüpfung der Gallenfarbstoff-Apoprotein-Bindung von C-Phycocyanin aus *Spirulina Maxima* und an Modellverbindungen.
Dissertation München.
- Schuster, A., Köst, H.P., Rüdiger, W., Holroyd, J.A. und Brown, S.B. (1983):
Incorporation of haem into phycocyanobilin in levulinic acid treated *Cyanidium caldarium*.
Plant Cell Reports, **2**, 85-87.
- Schwarz, H. und Schneider, H.A.W. (1987):
Immunological assay of phytochrome in small sections of roots and other organs of maize (*Zea mays* L.) seedlings.
Planta, **170**, 152-160.

Sharma, R. (1985):

Phytochrome regulation of enzyme activity in higher plants.
Photochem. Photobiol., **41**, 747-755.

Sharrock, R.A., Lissemore, J.L. und Quail, P.H. (1986):

Nucleotide and amino acid sequence of a Cucurbita phytochrome cDNA clone: Identification of conserved features by comparison with Avena phytochrome.
Gene, **47**, 287-295.

Shimazaki, Y., Cordonnier, M.M. und Pratt, L.H. (1983):

Phytochrome quantitation in crude extracts of Avena by enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies.
Planta, **159**, 534-544.

Shimazaki, Y. und Pratt, L.H. (1985):

Immunochemical detection with rabbit polyclonal and mouse monoclonal antibodies of different pools of phytochrome from etiolated and green Avena shoots.
Planta, **164**, 333-344.

Shropshire, W.J. und Mohr, H. (1983):

Photomorphogenesis. Encyclopedia of plant physiology, new series. Vol. 16a und 16b, Springer Verlag, Berlin.

Siegelman, H.W., Wieczorek, G.A. und Turner, B.C (1965):

Preparation of calcium phosphate for protein chromatography.
Anal. Biochem., **13**, 402-404.

Song, P.S. (1985):

Primary molecular events in aneural cell photoreceptors.
In: Sensory Perception and Transduction in Aneural Organism. Colombetti, G., Lenci, F., and Song, P.S. eds., Plenum Press, New York, 47.

Sonderegger, P., Jaussi, R., Gehring, H., Brunschweiler, K. und Christen, P. (1982):

Peptide mapping of protein bands from PAGE by chemical cleavage in gelpieces and re-electrophoresis.
Anal. Biochem., **122**, 298-301.

- Speth, V., Otto, V. und Schäfer, E. (1986):
Intracellular localisation of phytochrome in oat coleoptiles by electron microscopy.
Planta, **168**, 299-304.
- Speth, V., Otto, V. und Schäfer, E. (1987):
Intracellular localisation of phytochrome and ubiquitin in red-light-irradiated oat coleoptiles by electron microscopy.
Planta, **171**, 332-336.
- Stark, G.R., Stein, W.H. und Moore, S. (1960):
Reactions of the cyanate present in aqueous urea with amino acids and proteins.
J. Biol. Chem., **235**, No.11, 3177-3181.
- Stromska, D.P. (1982):
Isoelectric focusing of tubulin in a new type of charge-balanced agarose.
Anal. Biochem., **119**, 387-391.
- Takimoto, A. und Saji, H. (1984):
A role of phytochrome in photoperiodic induction. Two-phytochrome-pool theory.
Physiol. Plant., **61**, 675-682.
- Thoma, H. (1982):
Regeneration des Cyanobakteriums *Synechococcus* 6301 nach Sulfatmangel. Protein- und Ribonukleinsäureanalyse.
Diplomarbeit, Universität München.
- Thomas, B., Crook, N.E. und Penn, S.E. (1984):
An enzyme-linked immunosorbent assay for phytochrome.
Physiol. Plant., **60**, 409-415.
- Thompson, B.J., Dunn, M.J., Burghes, A.H.M. und Dubowitz, V. (1982):
Improvements of isoelectric focusing in agarose for direct tissue isoelectric focusing.
Electrophoresis, **3**, 307-314.
- Thümmler, F., Brandlmeier, T. und Rüdiger, W. (1981):
Preparation and properties of chromopeptides from the Pfr-form of phytochrome.
Z. Naturforsch., **36c**, 440-449.

Thümmler, F. (1984):

Der Phytochrom-Chromophor: Chemie der Photokonversion von Phytochrom.

Dissertation, Universität München.

Tobin, E.M. und Silverthorne, J. (1985):

Light regulation of gene expression in higher plants.

Ann. Rev. Plant Physiol., **36**, 569-593.

Tokuhisa, J.G., Daniels, S.M. und Quail, P.H. (1985):

Phytochrome in green tissue: Spectral and immunochemical evidence for two distinct molecular species of phytochrome in light-grown *Avena sativa* L.

Planta, **164**, 321-332.

Tokuhisa, J.G. und Quail, P.H. (1987):

The levels of two distinct species of phytochrome are regulated differently during germination in *Avena sativa*.

Planta **172**, 371-377.

Towbin, H., Staehlin, T. und Gordon, J. (1979):

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications.

Proc. Natl. Acad. Sci., **76**, 4350-4354.

Vierstra, R.D. und Quail, P.H. (1982a):

Proteolysis alters the spectral properties of 124 kD phytochrom from *Avena*.

Planta, **156**, 158-165.

Vierstra, R.D. und Quail, P.H. (1982b):

Native phytochrome: Inhibition of proteolysis yields a homogenous monomer of 124 kilodaltons from *Avena*.

Proc. Natl. Acad. Sci., **79**, 5272-5276.

Vierstra, R.D. und Quail, P.H. (1983a):

Purification and initial characterization of 124-kilodalton phytochrome from *Avena*.

Biochem., **22**, 2498-2505.

Vierstra, R.D. und Quail, P.H. (1983b):

Photochemistry of 124-kilodalton *Avena* phytochrom in vitro.

Plant Physiol., **72**, 264-267.

Vierstra, R.D. und Quail, P.H. (1985):

Spectral characterization and proteolytic mapping of native 120-kilodalton phytochrome from *Cucurbita pepo* L.
Plant Physiol., **77**, 990-998.

Vierstra, R.D. und Quail, P.H. (1986):

The protein.

In: Photomorphogenesis in plants, p.38, R.E. Kendrick und G.H.M. Kronenberg, Herausgeber. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster.

Vierstra, R.D., Quail, P.H., Hahn, T.R. und Song, P.S. (1987):

Comparisons of the protein conformations between different forms (Pr and Pfr) of native (124 kDa) and degraded (118/114 kDa) phytochrome from *Avena sativa*.

Photochem. Photobiol., **45**, 429-432.

Weinstein, J.D. und Beale, S.J. (1984):

Biosynthesis of protohem a and heme a precursors solely from glutamate in the unicellular red alga *Cyanidium caldarium*.

Plant Physiol., **74**, 146-151.

Willoughby, E.W. und Lambert, A. (1984):

A sensitive silver stain for proteins in agarose gels.
Anal. Biochem., **130**, 353-358.

Wong, Y.-S., Cheng, H.C., Walsh, D.A. und Lagarias, J.C. (1986):

Phosphorylation of *Avena* phytochrome in vitro as a probe of light-induced conformational changes.

J. Biol. Chem., **261**, 12089-12097.

Zechel, K. (1977):

On the resolution of polypeptides by isoelectric focusing in polyacrylamide gels in the presence of urea and nonidet-p40.

Anal. Biochem., **83**, 240-251.

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Rüdiger am Botanischen Institut der Universität München durchgeführt.

Herrn Herrn Prof. Dr. W. Rüdiger danke ich herzlich für die Unterstützung dieser Arbeit durch stetes Interesse, hilfreiche Ratschläge und Diskussionen.

Frau Marlene Binder danke ich für die wertvolle Mitarbeit.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Peter Quail, Dr. Alan Jones und ihrem Arbeitskreis für die freundliche Aufnahme und Betreuung während meines Aufenthalts in Madison.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H-J.A.W. Schneider und Herrn Dr. H. Schwarz, Botanisches Institut der Universität Köln, für die Überlassung von monoklonalen Antikörpern bedanken.

Meinen Phytochromkollegen Fritz Thümmler, Rudi Grimm und Ulrich Reiff möchte ich für die gute Zusammenarbeit und interessante Diskussionen danken.

Auch allen Kollegen und Freunden, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, gilt mein Dank.

Nicht zuletzt möchte ich mich ebenso bei meiner Frau für ihre Geduld und ihr Verständnis bedanken.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für die finanzielle Unterstützung gedankt.

Lebenslauf

25. 1. 1957	Geburt in Prien am Chiemsee
1963 - 1967	Volksschule in Landsberg am Lech
1967 - 1976	Dominikus-Zimmermann-Gymnasium Landsberg
1976	Beginn des Biologiestudiums an der Universität München
1977 - 1978	Bundeswehr
1978	Fortsetzung des Studiums
1980	Diplom-Biologen-Vorprüfung
1982	Diplom-Biologen-Hauptprüfung
1983	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Phytochemie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Rüdiger
1984	Beginn der Dissertation am Lehrstuhl für Phytochemie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Rüdiger
17.11.84	Heirat mit Frau Cornelia Brosche

